

Tesis de Posgrado

Comportamiento exploratorio en el cangrejo *Chasmagnathus granulatus* : habituación y aprendizaje apetitivo

Dimant, Beatriz

1991

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Dimant, Beatriz. (1991). Comportamiento exploratorio en el cangrejo *Chasmagnathus granulatus* : habituación y aprendizaje apetitivo. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2464_Dimant.pdf

Cita tipo Chicago:

Dimant, Beatriz. "Comportamiento exploratorio en el cangrejo *Chasmagnathus granulatus* : habituación y aprendizaje apetitivo". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1991.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2464_Dimant.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

**COMPORTAMIENTO EXPLORATORIO
EN EL CANGREJO *Chasmagnathus granulatus*.
HABITUACIÓN Y APRENDIZAJE
APETITIVO**

Autora : Beatriz Dimant

Director : Dr. Héctor Maldonado

LABORATORIO DE FISIOLÓGÍA DEL COMPORTAMIENTO ANIMAL
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Tesis para optar al título de
Doctora en Ciencias Biológicas

*Tesis.
2464
ej. 2.*

1991

Con amor a :

Ítalo

Mariela, Lucía

y Marcelo

mis padres

mis hermanos

mis amigos

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer sinceramente a todos los que de una u otra forma contribuyeron a la elaboración de esta tesis:

Al Dr. Héctor Maldonado por la dedicación puesta en mi formación en esta disciplina, por la confianza depositada, por su ayuda y su amistad.

Al Dr. Josué Núñez por la enseñanza durante mi primer etapa en la investigación y por su afecto.

A mis compañeros de laboratorio:

 Ángel Vidal por su ayuda constante.

 Mariana Lozada, Arturo Romano, Alicia Denti, Gabriela Hermitte, Daniel Tomsic, Ana Rakitín, Maria Eugenia Pedreira, por los momentos compartidos a lo largo de estos años.

A mi marido y a mis hijas por su Amor, Confianza y Solidaridad.

A mis padres por su Ejemplo y su Bondad

ÍNDICE

	Página
CAPÍTULO I : INTRODUCCIÓN	1
I. 1 Comportamiento defensivo y exploratorio	2
I. 2 Habituaación de la actividad exploratoria	6
I. 3 Métodos y procedimientos experimentales en el estudio de la habituaación de la exploración	8
I. 4 Estudio de los mecanismos íntimos de la habituaación de la exploración	10
I. 5 Contingencia de la habituaación de la exploración con otros procesos de memoria	12
I. 6 Comportamiento defensivo y exploratorio en cangrejos	14
I. 7 El comportamiento defensivo y exploratorio en la organización funcional de cerebro de los decápodos	16
I. 8 El cangrejo <i>Chasmagnathus granulatus</i> como modelo experimental	17
I. 9 Objetivos de la Tesis	20
CAPÍTULO II : MATERIALES Y MÉTODOS	21
II. 1 Animales	22
II. 2 Diseño experimental	23
II. 3 Procedimiento	26

CAPÍTULO III : HABITUACIÓN DE LA EXPLORACIÓN	27
III. 1 Experimento 1	28
III. 1. 1 Método	28
III. 1. 2 Resultados y discusión	29
III. 2 Experimento 2	35
III. 2. 1 Método	35
III. 2. 2 Resultados y Discusión	36
III. 3 Experimento 3	39
III. 3. 1 Método	39
III. 3. 2 Resultados y Discusión	40
 CAPÍTULO IV : CONDICIONAMIENTO INSTRUMENTAL APETITIVO	 43
IV. 1 Experimento 1	44
IV. 1. 1 Método	44
IV. 1. 2 Resultados y Discusión	45
VI. 2 Experimento 2	54
Experimento 2 a	54
IV. 2. 1 Método	54
IV. 2. 2 Resultados y Discusión	55
Experimento 2 b	57

IV. 2. 3	Método	57
IV. 2. 4	Resultados y Discusión	57
IV. 3	Experimento 3	61
IV. 3. 1	Método	61
IV. 3. 2	Resultados y Discusión	62
 CAPÍTULO V : PERSPECTIVAS DE LOS DOS PROCESOS DE MEMORIA COMO MODELOS EXPERIMENTALES		 70
V. 1	Experimento 1	72
V. 1. 1	Método	72
V. 1. 2	Resultados y Discusión	74
V. 2	Experimento 2	77
V. 2. 1	Método	77
V. 2. 2	Resultados y Discusión	78
 CAPÍTULO VI : CONCLUSIONES		 80
 CAPÍTULO VII : BIBLIOGRAFÍA		 83

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

1. 1. Comportamiento defensivo y exploratorio.

El tema central de esta tesis se refiere al comportamiento exploratorio en el cangrejo *Chasmagnathus granulatus*, pero puesto que, como se verá luego, su comportamiento defensivo ha sido intensamente estudiado en este Laboratorio, comenzaremos haciendo un paralelo entre ambos.

Incluimos en el concepto de **comportamiento defensivo** a las acciones *provocadas* por estímulos que señalizan perjuicios actuales o potenciales a los intereses vitales del animal, así como acciones *espontáneas* que tiendan a protegerlo de esos perjuicios en el futuro. Por lo tanto, este concepto abarca todos los componentes agonísticos que se indentifican en la interacción intra- e inter-específica (e.g. Hazlett y Estabrook, 1974), es decir, no sólo comprende a los actos agonísticos en sí (ataque y huida) sino también a las reacciones crípticas, a la producción de señales que contribuyen a mantener el *control agonístico* y a las acciones preventivas. Entre las primeras podemos mencionar todos los cambios cromatofóricos rápidos provocados por una perturbación (e.g. *Sepia officinalis*; Ferguson y Messenger, 1991); las posturas de inmovilidad ante la presencia de un enemigo (e.g. reacción críptica en los primeros estadíos del mántido *Stagmatoptera biocellata*; Balderrama y Maldonado, 1973); la liberación de sustancias opacas (e.g. cefalópodos; Hall, 1956). Entre los muchos ejemplos posibles de las señales agonísticas, cuya función es evitar la contienda, mencionamos la *reacción deimática* en mántidos (Maldonado, 1970) y el "jabbing" de las gaviotas (Tinbergen, 1959). Entre las acciones espontáneas preventivas tomamos como ejemplo la acción de las larvas de la polilla *Catocala cerogama*.

la que después de comer gran parte de una hoja, corta el pecíolo, evitando así dejar rastros de su presencia en el lugar (Heinrich, 1979). Es interesante recordar que según este autor, polillas filogenéticamente cercanas a *Catocala cerogama* pero con su cuerpo protegido por espinas, pelos y toxinas, no presentan la acción preventiva, sugiriendo que el proceso selectivo ha usado estrategias distintas ("comportamental" en un caso y "morfológica" en otro) con iguales fines defensivos.

Con el nombre de **comportamiento exploratorio** entendemos toda locomoción no-dirigida, así como toda actividad de inspección o escudriño, *espontánea* o *provocada* por un estímulo externo, cuya función es ganar información sobre el entorno. Al referirnos solamente a locomoción no-dirigida, pretendemos excluir los casos de desplazamientos del animal basados en una información concreta sobre el objetivo de su locomoción. El ejemplo de la actividad recolectora de la abeja ilustra este distingo: los primeros viajes en los que la pecoreadora carece de toda información sobre una fuente, serían típicamente exploratorios; por el contrario, los viajes posteriores de esa misma abeja hacia una fuente ya identificada, así como aquellos que realizan las obreras reclutadas, no serían casos de comportamiento exploratorio. Es decir, la ausencia de información sobre lo que se explora es caracter diagnóstico de este comportamiento.

Como resulta de la definición, puede haber comportamiento exploratorio sin estimulación externa, y más aún, la exploración puede darse sin un estímulo "concreto" interno: hambre, sed, apareamiento o refugio. En efecto, los animales pueden explorar su entorno aunque no tengan ninguna de esas necesidades durante el tiempo de la exploración, como se ha demostrado en experimentos con *Carassius auratus* (Delorge, 1968).

La otra modalidad de comportamiento exploratorio que incluye la definición, se refiere al caso de la actividad provocada por estimulación externa. Cuando se coloca una rata en un entorno desconocido o expuesta a objetos novedosos, se desencadena una actividad exploratoria inicial manifiestamente mayor que la desplegada en un lugar ya conocido o ante objetos familiares (Bardo y col, 1989; Welker, 1959; Bindra y Spinner, 1958; Berlyne, 1955); y de la misma manera, el cangrejo ermitaño *Pagurus bernhardus* inicia la activa exploración de una nueva conchilla que se emplaza en su entorno, pero permanece indiferente o emplea poco tiempo en investigar conchillas que ya estaban (Jackson y Elwood, 1989). Es decir, la **novedad** constituye el estímulo desencadenante del comportamiento exploratorio provocado.

El distingo entre exploración espontánea y provocada puede, sin embargo, no ser tan evidente como se ha planteado, ya que se basa exclusivamente en la naturaleza del factor desencadenante sin tener en cuenta el desarrollo posterior de la actividad. En efecto, una vez iniciada la exploración espontánea aparecerían factores motivantes de la misma y cambiaría entonces el tipo de comportamiento exploratorio. Por lo tanto, la actividad exploratoria espontánea, tal como la concebimos, debe suponerse necesariamente efímera, salvo si se colocase al animal en condiciones artificiales, como cuando se lo recluye en un entorno constante y monótono (e.g. un actómetro) para estudiar ritmos de actividad. De ahí que, en adelante, toda vez que en esta tesis hablemos de comportamiento exploratorio debe entenderse que nos referimos a la actividad exploratoria **provocada**.

Como se ha destacado más arriba, la actividad exploratoria está destinada sobre|todo a reunir información, la que en muchos casos sólo posteriormente va a ser usada para satisfacer una necesidad. De ahí

entonces que pueda considerársela como un instrumento para el aprendizaje del animal (Heymer, 1982), es decir, un medio para posibilitar cambios adaptativos en su comportamiento. En efecto, cabe recordar que los primeros ejemplos sobre aprendizaje latente fueron aquellos en los que se demostraba que una rata aprendía con mucha más rapidez a recorrer un determinado trayecto para obtener comida, si previamente se le permitía explorar el laberinto (Maier, 1932; Blodgett, 1929).

Respecto a la adquisición de información, podríamos decir que los comportamientos defensivo y exploratorio son antitéticos. La actividad defensiva parte de una certeza: el estímulo representa un daño actual o potencial, y por lo tanto la función del comportamiento no es adquirir información acerca del estímulo sino evitar los perjuicios que él denota; la actividad exploratoria, por el contrario, parte de la ignorancia acerca del entorno o el objeto novedoso, y por lo tanto su función no es cambiar una situación perjudicial sino adquirir información. Si se usa las nociones de actividad "simpática" y "parasimpática", como se las suele emplear para referirse a la actividad autónoma del sistema nervioso de mamíferos, podríamos decir que el comportamiento defensivo, en cuanto implica movilización de recursos para cambiar una situación, podría encuadrarse como actividad "simpática", mientras que el comportamiento exploratorio, buscador de información y no innovador de una situación, podría considerarse como actividad "parasimpática".

I. 2 Habituação de la actividad exploratoria.

De lo dicho en la sección anterior, se concluye que la exploración, en cuanto actividad "recolectora" de información, es un comportamiento básico, preliminar, condicionante del aprendizaje y de la consumación de otras actividades, y de ahí entonces que se encuentren ejemplos de este comportamiento en todos los niveles de la escala filogenética. Sin embargo, debe esperarse que haya siempre un decremento temporal de la tendencia exploratoria en un mismo contexto, tan vital para la sobrevivencia del animal como la exploración en sí; y en efecto, se demuestra que esa disminución con el tiempo es también un fenómeno ubicuo y básico.

Glanzer (1953) llamó al decremento de la exploración, *saciación del estímulo*. No obstante, cuando Thomson y Spencer (1966) publicaron su famosa revisión sobre la habituación, listando nueve condiciones paramétricas de este tipo de aprendizaje, opinaron que el proceso descrito por Glanzer debía ser considerado como un ejemplo más de habituación. Conforme a la definición de Thorpe (1963), la *habituación* se manifiesta como una disminución de la probabilidad de ejecución o intensidad de una respuesta, ante la presentación repetida de un mismo estímulo que no es seguido de un refuerzo. Por otro lado, Peeke (1984) la define como el decremento relativamente permanente de la disposición para responder a un estímulo como resultado de su presentación reiterada o constante; estando ese decremento específicamente relacionado con el estímulo original, de manera que la respuesta puede ser reinstalada por otro estímulo. Esta última definición viene a destacar algunos aspectos notables de este proceso que no estaban incluidos en la primera, a saber:

1) La habituación se define por un decremento en la *disposición* a la respuesta y no necesariamente en la respuesta. Puede haber entonces habituación sin caída de la respuesta e inclusive *sin* respuesta (Davis y Wagner, 1969; Peeke y Veno, 1976; Tomsic y col., 1991); en otras palabras, la adquisición de la habituación durante el entrenamiento depende del *estímulo* y no de la *respuesta*. Sin embargo, la cuantificación de la respuesta durante la retención nos va a dar una medida de la habituación adquirida.

2) La habituación puede darse no sólo por la presentación iterativa del estímulo sino también por su presentación permanente.

3) La condición definitoria de la habituación es la *estímulo-especificidad*, que excluye como explicaciones alternativas de este proceso, tanto a la fatiga motora como a la adaptación sensorial, las que presentan *respuesta-especificidad*.

Estas observaciones de la definición de Peeke, adquieren especial relevancia cuando se considera la habituación de la exploración. En efecto, aunque Thomson y Spencer identificaron a la saciación del estímulo con la habituación, no puede dejar de señalarse algunas características peculiares de ese caso. En el comportamiento exploratorio la presentación constante y sucesiva del estímulo depende de la propia actividad, es decir, el *estímulo* depende de la *respuesta*, y por lo tanto también la habituación. Sin embargo, el proceso debe considerarse **habituación** siempre que se demuestre que el decremento en la respuesta, revelado durante la retención, es *estímulo-específico* y no *respuesta-específico*.

I. 3 Métodos y procedimientos experimentales en el estudio de la *habituación de la exploración*.

A.- Arena de exploración (cruce de marcas).

En el caso de las ratas, el recurso experimental más empleado ha sido la **arena de exploración** (*open field*). Un ejemplo de ese dispositivo lo encontramos en Introini-Collison y col. (1987): el animal era colocado en una caja de 45 x 32 x 20 cm, con paredes oscuras y el piso dividido en seis rectángulos, estimándose el nivel de su actividad exploratoria por el número de líneas cruzadas con las cuatro patas durante 15 minutos. La retención se mide generalmente a las 24 horas, considerándose que cuanto menor es la actividad exploratoria durante ese ensayo, mayor será la retención de la habituación (Platel y Porsolt, 1982; Introini-Collison y col, 1987). Muy comunmente se utiliza la diferencia de actividad exploratoria entre el primero y segundo día como una medida de la retención. Sin embargo, cabe observar que el procedimiento más correcto para esa evaluación, sería una comparación de niveles de exploración durante la sesión de retención de un grupo que ha sido entrenado el día anterior (grupo experimental) versus un grupo control que recibe entrenamiento por primera vez durante esa sesión. En efecto, Rescorla (1988) recalca que el aprendizaje debe ser descripto como una diferencia en el comportamiento a tiempo t_2 , en función de una diferencia de experiencias a tiempo t_1 , y advierte, por lo tanto, contra el método que evalúa el nivel de aprendizaje sólo por simple comparación entre comportamientos a t_1 y t_2 , ya que "el comportamiento de un organismo puede diferir entre esos tiempos por razones que no son debidas al aprendizaje". Esta observación tiene especial importancia cuando se trata

de un caso de habituación, ya que como hemos visto, el curso del decremento de la respuesta a t_1 (*time of input*, Rescorla, 1988) no es necesariamente indicativo del nivel de adquisición de la habituación, es decir, puede no guardar relación con el nivel de respuesta a t_2 (*time of assessment*).

Cabe hacer notar que en los modelos más recientes de **arenas de exploración**, la medida de la actividad se hace automáticamente mediante el uso de sistemas de células fotoeléctricas (Platel y Porsolt, 1982), o por un analizador de imágenes y una estimación constante de la ocupación de nuevas áreas (Martínez y col., 1988). Además, en algunos experimentos con ratas esa medida se efectúa a través de un síntoma indirecto: el número de levantamientos (*rearings*) durante el tiempo de permanencia del animal en la arena de exploración (e.g. Rodgers y col., 1984).

B.- Laberinto de alternancia espontánea.

Otro método para estudiar la *habituación de la exploración*, es el así llamado de **alternancia espontánea**. Los animales colocados en un laberinto en T reciben un par de ensayos, sin refuerzo, con un largo intervalo entre ambos, demostrándose que tienden a alternar las ramas en elecciones sucesivas. Esta tendencia sería la resultante de la habituación a la rama que se visita en el primer ensayo, aumentándose así la probabilidad de entrar a la otra, en el segundo ensayo (e.g. Meyers y Domino, 1964; Squire, 1969).

C.- Tabla agujereada (frecuencia y duración de visitas).

Un tercer método de estudio de la *habituación de la exploración* está basado en el empleo del dispositivo de la **tabla agujereada**

(*hole-board apparatus*), consistente en un cámara cuyo piso tiene cuatro agujeros, con una celda debajo de cada uno que contiene, a veces, un objeto. Se considera que los animales (ratas o ratones) han efectuado una visita a una celda cuando introducen totalmente la cabeza. File y Wardill (1975 a, b) consideraron que la duración de una visita (*head-dipping*) es una medida válida de la exploración, puesto que cuando la celda contenía un objeto el tiempo de inspección era mayor y, en una segunda visita, la duración era siempre menor.

D.- Inspección de un objeto novedoso.

El fenómeno de habituación también se estudia en el caso de la exploración provocada por la presentación de un nuevo objeto en el entorno. El nivel de la **respuesta de inspección** se suele medir por la frecuencia y duración de la exploración del objeto (e.g. Poucet, 1989).

I. 4 Estudio de los mecanismos íntimos de la *habituación de la exploración*

En el estudio de los mecanismos que sirven al aprendizaje y memoria, es decir, en el análisis de las causas próximas de un proceso mnésico, se siguen dos tipos de estrategias: por un lado la *estrategia interventiva*, en la que se investiga las alteraciones que sobre la adquisición, retención y evocación de la marca mnésica, provoca la acción de diversos agentes en distintos momentos del proceso; por otro lado, la *estrategia de correlación*, en la que se estudia la correlación entre niveles de cambio en el comportamiento debidos al aprendizaje y niveles de cambio celular y/o molecular.

Entre los múltiples ejemplos de estudios sobre los mecanismos íntimos

de la *habituación de la exploración*, en los que se ha seguido una *estrategia interventiva*, se destacan aquellos que evalúan el carácter facilitador o depresor de diversas drogas.

a) ***Acción disruptora de la vasopresina***. La administración post-entrenamiento de AVP provoca un aumento de la actividad exploratoria de ratas en una **arena de exploración**, durante la retención, de una manera dosis y tiempo dependiente. Por el contrario, el antagonista AAVP tiene un efecto hipermnésico (Faiman, 1989).

b) ***Acción disruptora de drogas anticolinérgicas***. La administración de escopolamina inmediatamente antes del entrenamiento en una **arena de exploración** (Carlton y Vogel, 1965; Leaton, 1968), en una **tabla agujereada** (File, 1976) o en un **laberinto de alternancia espontánea** (Meyers y Domino, 1964; Squire, 1969), impide la adquisición de la exploración habituada. Por otro lado, el uso de fisostigmina, un agonista colinérgico, aumenta la retención en un **laberinto de alternancia espontánea** (Squire, 1969).

c) ***Acción de la dopamina***. Durante la habituación a la actividad de ratas en una **arena de exploración**, se comprobó que aquellas tratadas crónicamente con un receptor de la dopamina (SCH23390) mostraban una actividad locomotora mayor que los controles tratados crónicamente con solución salina (Hess y col., 1986).

d) ***Acción de opiáceos***. Inyecciones IP post-entrenamiento de naloxono en ratas, facilitan la retención de la *habituación de la exploración*, mientras que la beta-endorfina, leu-encefalina y el electroshock convulsivo la deprimen (Netto y col., 1986). Este efecto de la

acción opiácea es interpretado en términos de dependencia de estado (Izquierdo, 1984; Netto y col. 1987).

En contraste con el gran número de trabajos de interferencia, existen escasos ejemplos de la *estrategia de correlación* en estudios sobre la *habituaación de la exploración*. Así, se ha demostrado la liberación de beta-endorfina hipotalámica ante la exposición a un estímulo nuevo (Izquierdo y Netto, 1985 a, b), de manera tal que el comienzo del proceso de *habituaación de la exploración* estaría correlacionado con un cambio en el nivel de una endorfina endógena.

I. 5 Contingencia de la *habituaación de la exploración* con otros procesos de memoria.

Cuando un animal explora, puede aprender el valor positivo o negativo de algunos elementos del entorno, de tal manera que su comportamiento posterior en ese contexto se modifica de acuerdo a la experiencia adquirida. Por ello, debe suponerse que como consecuencia de la exploración, no sólo tiene lugar *habituaación de la exploración* sino también otro u otros procesos mnésicos. Un buen ejemplo de este fenómeno se halla en los experimentos con el paradigma de hallazgo de agua (Tenen, 1965; Le Moal y col., 1984). Las ratas eran colocadas en una **arena de exploración** y durante el curso de su actividad detectaban un tubo del que podían tomar agua. Si estos animales eran después sometidos a una nueva sesión, en condiciones de privación de agua, encontraban el tubo más rápidamente que un grupo control (aprendizaje asociativo), pero puesto que las ratas habían sido entrenadas en la **arena**, se supuso que ellas habían también adquirido una *habituaación de la exploración*. Esta

suposición quedó demostrada por el hecho de que animales no privados de agua presentaron, en la segunda sesión, un decremento de la tendencia exploratoria. Netto y col. (1986) dieron una prueba adicional: la administración post-entrenamiento de beta-endorfina, leu-enkefalina o un shock electroconvulsivo, es decir de agentes que interfieren con el procesamiento de la novedad (Izquierdo y col., 1984), produjeron una disrupción de la *habituación de la exploración* sin alterar la tarea adquirida de hallar agua.

A propósito de estos experimentos, Izquierdo y Cavalleiro (1976) señalaban: la "mayoría de los experimentos de aprendizaje incluyen el análisis específico de sólo una tarea, pero es posible que muchas situaciones de entrenamiento involucren la adquisición simultánea de más de un comportamiento". Creemos que no sólo existe esa posibilidad, sino que *necesariamente* todos los aprendizajes van acompañados de una *habituación de la exploración* ya que el comienzo de cualquier proceso mnésico implica una novedad. En otras palabras, no hay proceso de memoria sin una *habituación de la exploración*, inevitable y contingente.

Debe advertirse, sin embargo, que si la medida de la *habituación de la exploración* y la de los procesos de aprendizaje contingentes se hiciese sobre una misma condición paramétrica de respuesta (e.g. la latencia de entrada a la *arena de exploración*), podría concluirse, equivocadamente, que los aprendizajes contingentes no coexisten con la habituación sino que la anulan, por ejemplo, cuando el proceso contingente consiste en el aprendizaje que en esa *arena* puede obtenerse comida o agua.

1. 6 Comportamiento defensivo y exploratorio en cangrejos.

Un creciente número de trabajos se han llevado a cabo en los últimos años sobre procesos mnésicos en cangrejos, relacionados principalmente con el comportamiento defensivo.

a) En *Chasmagnathus granulatus*: habituación de la respuesta de escape a un estímulo aversivo o de peligro (Lozada y col., 1990; Rakitín y col., 1991; Romano y col., 1991); acción de opiáceos y GABA sobre la respuesta de escape (Brunner y Maldonado, 1988; Maldonado y col., 1989; Vallengia y col., 1989; Romano y col., 1990; Tomsic y Maldonado, 1990; Tomsic y col., 1991); acción de opiáceos sobre la *reacción lateral del merus* (Lozada y col., 1987); aprendizaje de evitación pasiva (Denti y col., 1988); aprendizaje de evitación activa (Fernandez-Duque y col., en prensa); modulación facilitatoria de la respuesta de escape (Hermitte y Maldonado, en prensa).

b) En *Carcinus maenas*: aprendizaje relacionado con el reflejo de retracción del ojo (Abramson y Feiman, 1987; Feiman y Abramson, 1987; Feiman y col., 1987; Abramson y col., 1988; Abramson y Feiman, 1988; Feiman y col., 1990).

En contraste, son muy escasos los estudios sobre cangrejos referidos al comportamiento exploratorio, pese a que dicha actividad es muy evidente, principalmente en los cangrejos intertidales y semiterrestres. En efecto, estos decápodos presentan lentos movimientos a lo largo del eje de las X (*sansu*: Ferguson, 1967) con frecuentes regresos, aparentemente no progresando en dirección a un objetivo dado (Herrkind, 1983), como es

el caso de los cangrejos azules (*Callinectes sapidus*) que presentan amplios desplazamientos sobre la playa sumergida por la marea (Nishimoto, 1980).

Comportamientos exploratorios en decápodos, consistentes en inspección o escudriño de objetos o lugares novedosos, han sido investigados en el cangrejo ermitaño *Pagurus bernhardus* (Hazlett, 1969), en el camarón *Stenopus hispidus* (Johnson, 1977) y en estomatópodos (Reaka, 1980).

Podemos mencionar sólo tres ejemplos de estudios sobre *habitación de la exploración*:

a) un antiguo trabajo de Drzewina (1910) informando que el cangrejo ermitaño *Clibanarius* no intenta explorar la conchilla sellada de un gasterópodo luego de haber realizado varias inspecciones infructuosas, pero que su actividad exploratoria se recupera ante la ubicación, en el mismo entorno, de otra conchilla;

b) los trabajos más recientes de Jackson y Elwood (1989 a, b) con el cangrejo ermitaño *Pagurus bernhardus* (paralelos en muchos aspectos al trabajo de Drzewina, aunque estos autores no lo citan), demostrando que la duración de inspección a conchillas selladas por parte de ejemplares desnudos disminuye con la propia actividad exploratoria;

c) una referencia incidental en el estudio de Martínez y col. (1988) acerca de la influencia dopaminérgica y opiácea sobre la actividad locomotora en el cangrejo terrestre *Gecarcinus lateralis*, donde informan que los animales que 30 min antes habían estado explorando la cámara experimental durante 12 min, exhiben una actividad exploratoria menor que la inicial.

I. 7 El comportamiento defensivo y exploratorio en la organización funcional del cerebro de los decápodos.

Sandeman (1990) considera tres niveles de comportamiento en decápodos.

Las acciones del Nivel 1 son aquellas donde un estímulo relativamente simple (e.g. un estímulo a los pelos mecanoreceptores) da como resultado una respuesta que involucra en todos los casos a los mismos grupos de músculos. El número de neuronas indispensables para la respuesta es pequeño; las latencias son cortas lo que implica una unión directa entre la entrada sensorial y la salida motora; el movimiento tiene una dirección particular y la intensidad de la respuesta un solo grado de libertad. El comportamiento es altamente predecible. Un ejemplo de acción de nivel 1 se encuentra en la retracción protectora del ojo del cangrejo.

Las acciones del Nivel 2 pueden ser definidas como aquellas en las cuales los estímulos son recibidos por receptores contenidos en órganos sensoriales complejos, altamente selectivos (estatocistos, ojos, propioceptores) que proporcionan una señal que determina cualitativa y cuantitativamente la naturaleza de la respuesta comportamental. Las respuestas pueden involucrar conjuntos de sistemas motores recíprocamente activos, a menudo controlados por retroalimentación sensorial e influenciadas por varias entradas aferentes. Un ejemplo de acción de nivel 2 puede encontrarse en las acciones compensatorias de los pedúnculos oculares del cangrejo y en su reacción de escape ante un estímulo de peligro. Estas respuestas, aunque estrechamente ligadas al estímulo, varían en su intensidad con el estado de alerta del animal,

brindándonos un buen sistema de ensayo (*test-bed*) para explorar la acción de neuromoduladores en el cerebro (Erber y Sandeman, 1990 a, b).

Las acciones del **Nivel 3** están definidas como aquellas que no necesitan un estímulo externo sostenido para su persistencia. La iniciación del comportamiento parece provenir del animal mismo, aunque es posible establecer las condiciones bajo las cuales es más probable que ocurra. En estas actividades están involucrados muchos sistemas aferentes y motores. El comportamiento exploratorio de un animal es un buen ejemplo de actividad a nivel 3. Sandeman destaca el papel del segundo par de antenas de los crustáceos decápodos en el comportamiento exploratorio de tipo táctil.

Por lo tanto, de acuerdo a este esquema, mientras componentes del comportamiento defensivo pueden ser acciones reflejas (**nivel 1**) o respuestas que implican un procesamiento de la información aferente o retroalimentada (**nivel 2**), el comportamiento exploratorio tiene un fuerte componente endógeno ya que puede iniciarse sin la estimulación externa (**nivel 3**).

1. 8 El cangrejo *Chasmagnathus granulatus* como modelo experimental.

El cangrejo *Chasmagnathus granulatus* ha acreditado ventajas como animal experimental a través de su uso en una serie de trabajos en Fisiología:

a) los realizados en el Laboratorio de Fisiología del Comportamiento Animal de esta Facultad que fueron mencionados antes, y que versan principalmente sobre memoria animal y moduladores;

b) los efectuados en el Laboratorio de Fisiología Animal Comparada, también de esta Facultad, interesados principalmente en los efectos de agentes tóxicos y en el estudio del metabolismo energético (Dezi y col., 1987; Rodríguez y Lombardo, 1991; Montserrat y col., 1991; Rodríguez y Montserrat, 1991; Rodríguez y Amín, 1991);

c) los llevados a cabo en la Universidad de Río Grande, Brasil, sobre regulación del nivel de glucosa en hemolinfa y mecanismos de adaptación metabólica (Santos y Colares, 1986; Santos y col., 1987; Santos y Nery, 1987; Santos y col., 1988; Santos y Stefanello, 1991). Esas ventajas experimentales pueden ser resumidas en los siguientes puntos.

1) *Chasmagnathus* se obtiene en abundancia desde su entorno natural (e.g. cangrejales de San Clemente del Tuyú), prácticamente durante todo el año. Su mantenimiento en el laboratorio es sencillo, sin mayores requerimientos, y conservan un buen nivel de reactividad aún después de un mes de permanencia.

2) Su carácter de animal estuarino y semiterrestre (zona sumergida entremareas; Herrnkind, 1983), lo hace menos susceptible a cambios de salinidad, pH y temperatura, así como independiente de un flujo constante de agua.

3) Posee respuestas comportamentales conspicuas y fácilmente reproducibles en el laboratorio (e.g. despliegue lateral del merus, respuesta de escape). Su carácter semiterrestre favorece el estudio y cuantificación de estos comportamientos, así como los registros electrofisiológicos desde el animal entero (Nalbach, 1990).

4) El sistema nervioso es accesible, con neuronas fácilmente identificables. Presenta una buena recuperación después del manipuleo quirúrgico (e.g. implantación de electrodos). La administración de drogas en soluciones de hasta 100 μ l, es sencilla y está bien experimentada.

5) Tienen en común con todos los cangrejos una propiedad única: pese a presentar como los vertebrados una irrigación intraganglionar, carecen de barrera "hemato-encefálica" (Sandeman, 1967; Abbott, 1970). Por lo tanto, una droga administrada exógenamente tiene acceso al tejido nervioso de una manera inmediata y sin compartimentalización, lo que puede constituir una gran ventaja para algunos estudios de tipo farmacológico.

6) La capacidad mnésica de *Chasmagnathus* está ampliamente demostrada con relación a la respuesta de escape provocada por la presentación de un estímulo de peligro.

7) Se tiene apreciable información acerca de su distribución y varios aspectos de su biología general (e.g. Boschi, 1964; Botto y Irigoyen, 1979; Rocatagliatta y Schiavinni, 1987; Rodríguez y Dezi, 1987; D' Incao y col., 1990).

1. 9 Objetivos de la tesis.

Los propósitos de esta tesis pueden resumirse en los siguientes puntos.

- 1.- Estudiar la actividad exploratoria del cangrejo *Chasmagnathus granulatus* provocada por su ubicación en un nuevo ambiente.
- 2.- Investigar si esta actividad exploratoria es susceptible de ser habituada, poniendo a prueba la condición paramétrica de la estímulo-especificidad.
- 3.- Investigar la posibilidad de un proceso de aprendizaje contingente al de la *habituación de la exploración* y que sea consecuencia de esa exploración (un condicionamiento instrumental apetitivamente motivado).
- 4.- Evaluar la idoneidad de los modelos de memoria que se identifiquen como paradigmas para el estudio de los mecanismos mnésicos.

CAPÍTULO II:

MATERIALES Y MÉTODOS

II. 1 Animales

Los animales utilizados en los experimentos fueron siempre ejemplares machos adultos de cangrejos de la especie *Chasmagnathus granulatus*, con un ancho máximo de caparazón entre 2.8 y 3.2 cm y peso medio de 17 g. Estos animales fueron capturados en aguas salobres de menos de 1 m de profundidad y zonas intertidales de las rías de San Clemente del Tuyú, Provincia de Buenos Aires. Los cangrejos eran transportados en recipientes especialmente diseñados hasta el laboratorio, donde se los colocaba en tanques de plástico (35 x 48 x 27 cm) ubicados en el cuarto de mantenimiento, con una capa de agua de aproximadamente 2 cm de profundidad, sin aireación, a razón de 35 animales por tanque. El agua usada en los tanques y otros recipientes durante los experimentos era agua corriente declorada, a la que se le agregaba sales para obtener agua de mar artificial (salinidad: 12 ‰, pH 7.4-7.6). El cuarto de mantenimiento tenía un ciclo de 12 horas luz-oscuridad (luces de 07 a 19 hs). Los cangrejos eran alimentados con pellets de conejo (Nutrientes SA) cada 3 días y se les cambiaba el agua después de haber comido. La temperatura de los cuartos de experimentación y de mantenimiento permanecía dentro de un rango entre 19° a 24° C. Los experimentos se realizaban durante el período de luz, entre el 2do y el 6to día después de la llegada de los animales al laboratorio. Cada cangrejo era usado en un sólo experimento.

II. 2 Diseño experimental

Cada unidad experimental (**doble-cámara**) (Fig 1 y 2 a) consistía en una caja de plástico (25 x 25 x 15 cm) dividida en dos compartimentos de igual tamaño (25 x 12.5 x 15 cm) por una partición central: el compartimento oscuro (CO) y el compartimento claro (CC). CO tenía sus paredes pintadas de negro y un techo removible (TR) que impedía la entrada de luz directa. CC era iluminado por una lámpara (L) de 10 W y tenía las paredes pintadas de blanco. Una puerta deslizante en la partición central, que podía ser subida o bajada por la acción de un motor (M), permitía al cangrejo pasar de CO a CC o viceversa. El piso de CO se cubría con una capa de 0.5 cm de agua de mar preparada, y un zócalo de 1 cm no permitía la entrada del agua a CC. Un sistema infrarrojo emisor-receptor, estaba montado en un dispositivo semejante a una arcada (ER) en una de tres posiciones: cerca de la partición central en CC (posición 1, Fig 1), 10 cm de la partición en CC (posición 2, Fig 1), o cerca de la partición central en CO (posición 1', que no se muestra en la Fig 1). El deslizamiento de la puerta era comandado por una computadora (Fig 2 b) que registraba el intervalo entre el momento en que la puerta se subía y aquel en que el haz infrarrojo era interrumpido por primera vez por el cangrejo. A este intervalo de tiempo lo llamaremos **latencia**. Un espejo (ES, Fig 1 y 2 a) permitía al experimentador observar el interior del CC sin ser visto por el animal.

Había 40 doble-cámaras en el cuarto de experimentación, que se diseñaron y construyeron en el Laboratorio (Fig 2 b).

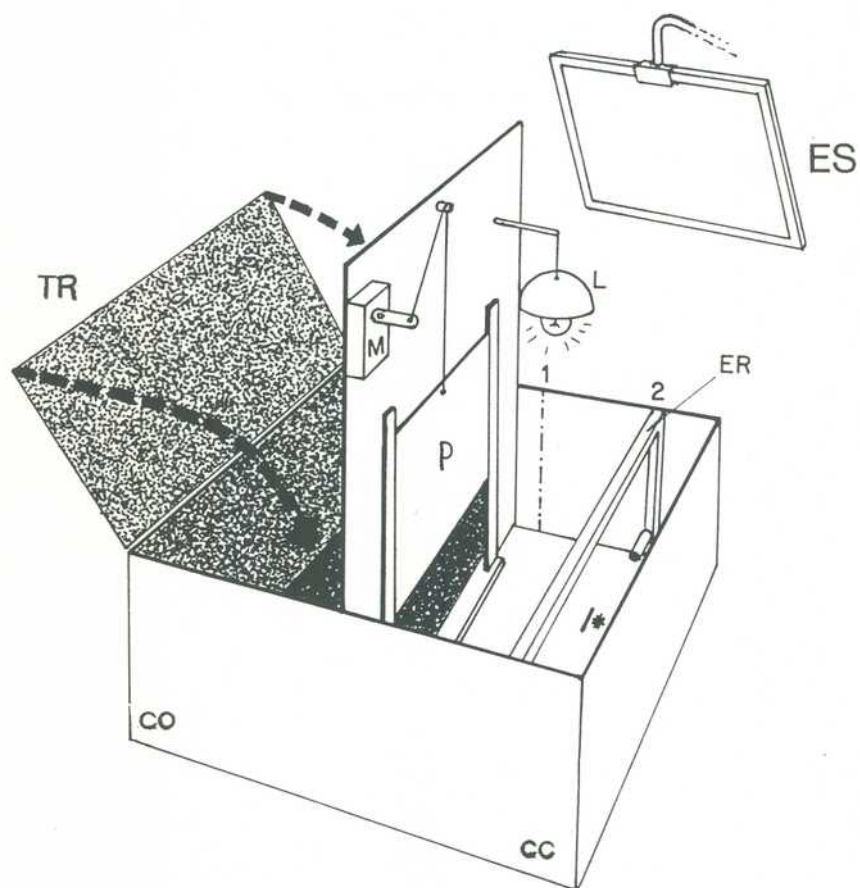


FIGURA 1: Unidad de entrenamiento (doble-cámara). CO: compartimento oscuro. CC: compartimento iluminado. TR: techo removible. P: puerta deslizante. M: motor. ER: sistema emisor-receptor infrarrojo. 1: posición de ER cercana a la partición en el CC. 2: posición de ER a 10 cm de la partición en el CC. I* : pequeño trozo de pescado. ES: espejo retrovisor



FIGURA 2:

a) Unidad de
entrenamiento
(doble-cámara).

b) Vista general de la
distribución de las
40 doble-cámaras y la
zona de comando y
registro.



II. 3 Procedimiento

Veinticuatro horas antes de comenzar el experimento los animales eran sometidos a una **prueba de selección**: cada cangrejo era dado vuelta sobre su dorso y sólo se aceptaban los animales que volvían inmediatamente a su posición normal. La razón de esta selección es que los cangrejos que retoman lentamente su posición, muestran baja respuesta a diversos estímulos y baja movilidad. Cada cangrejo seleccionado era individualizado con una plaquita de plástico numerada pegada en el dorso, y luego colocado en su tanque de mantenimiento.

CAPÍTULO III:
HABITUACIÓN DE LA
EXPLORACIÓN

III. 1 EXPERIMENTO 1

El propósito de este Experimento fue estudiar del comportamiento exploratorio de *Chasmagnathus* en la doble-cámara.

III. 1. 1 Método

Cada cangrejo era llevado del cuarto de mantenimiento al cuarto de experimentación y colocado en la doble-cámara, en CC o CO, con el sistema emisor-receptor en CC o CO, respectivamente, cerca de la partición central (posición 1 o 1') y con la puerta deslizante baja. Después de 10 min de adaptación, la puerta era levantada y se registraba la latencia en la computadora. El CC era observado a través del espejo (Fig 1 y 2 a) cada 5 min y se registraba el comportamiento del cangrejo como **permanencia** o **cambio** de acuerdo a si el animal estaba en el mismo o en un compartimento diferente respecto a la observación previa. Un cangrejo era considerado en CC siempre que todas las patas caminadoras estuvieran en ese compartimento. La puerta permanecía elevada durante 180 min, realizándose así 36 observaciones por sesión.

Ochenta cangrejos eran asignados al azar a dos grupos de 40 animales cada uno: el **grupo-CO**, inicialmente colocado en el compartimento oscuro, y el **grupo-CC**, en el compartimento claro.

III. 1. 2 Resultados y Discusión

Los valores de latencia media (seg) fueron 95.2 ± 19.0 para el *grupo-CO* vs 365.5 ± 44.1 para el *grupo-CC* ($t = 5.63$, $p < 0.001$) lo que indica que la tendencia inicial para pasar desde CO a CC es significativamente mayor que para pasar de CC a CO.

La Fig 3 ilustra el desempeño del *grupo-CO* para tres observaciones sucesivas (15 min), mostrando el porcentaje de cangrejos que presentaban al menos un **cambio** (cuadrados blancos, cambios de CC \leftrightarrow CO), 3 **permanencias** consecutivas en CC (cuadrados negros) y 3 **permanencias** consecutivas en CO (círculos blancos). De la observación de esta Figura se sugieren las siguientes conclusiones sobre el desempeño del grupo CO. Primero, el número de pasajes a través de la partición central disminuye y la tendencia a permanecer en CC aumenta con el tiempo; segundo, la tendencia a permanecer en CO es mucho menor que la de permanecer en CC, y se mantiene con el tiempo. Los análisis estadísticos convalidan tales conclusiones. La correlación entre el tiempo y el porcentaje de cangrejos, expresada por el coeficiente de correlación de Spearman (r_s) fue significativa para el **cambio** ($r_s = -0.94$, $p < 0.001$) y para la **permanencia** en CC ($r_s = 0.93$, $p < 0.001$), pero fue no significativa para la **permanencia** en CO ($r_s = -0.15$).

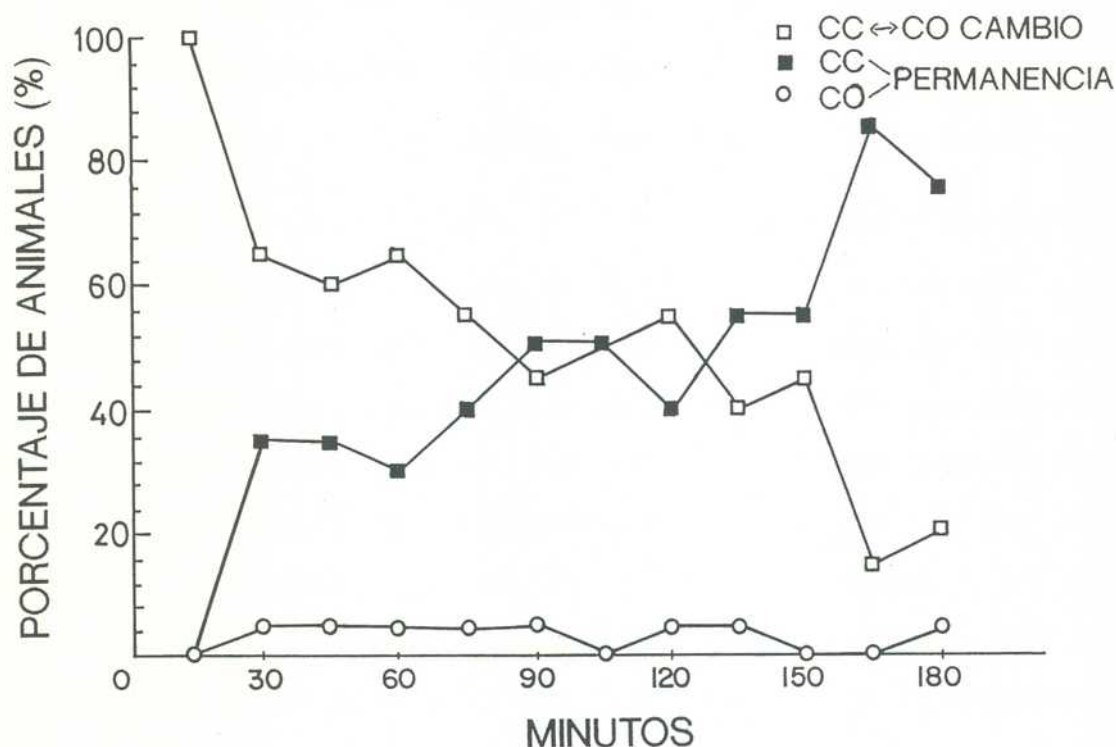


FIGURA 3 : Comportamiento exploratorio de cangrejos colocados inicialmente en CO (*grupo CO*). *Ordenadas:* porcentaje de animales. *Cuadrados blancos:* cambio CC ↔ CO: porcentaje de cangrejos hallados al menos una vez en un compartimento diferente entre 3 observaciones consecutivas. *Cuadrados negros:* permanencias en CC: porcentaje de cangrejos hallados en CC durante 3 observaciones consecutivas. *Círculos blancos:* permanencias en CO: porcentaje de cangrejos hallados en CO durante 3 observaciones consecutivas. *Abscisas:* tiempo a partir del momento en que se eleva la puerta ubicada en la partición central. Se realizaron observaciones en CC cada 5 minutos y se calculó el porcentaje para bloques de 3 observaciones consecutivas (15 minutos). Se observa que durante el primer bloque de 3 observaciones **todos** los cangrejos abandonaron el compartimento inicial.

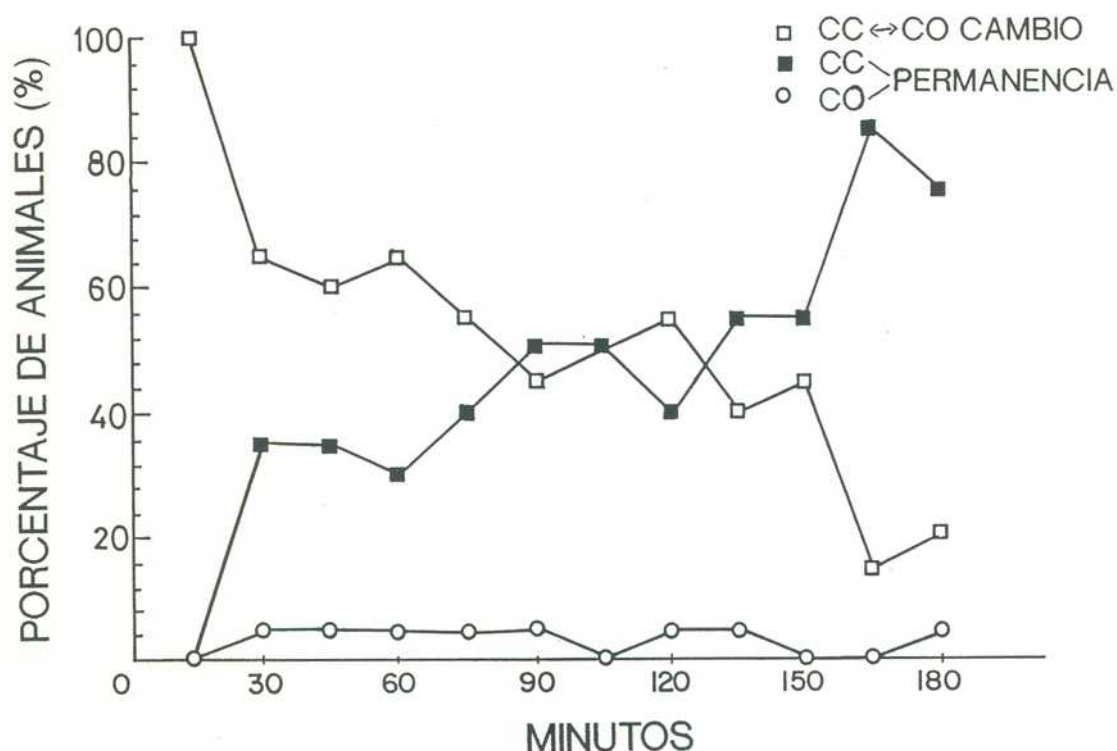


FIGURA 3 : Comportamiento exploratorio de cangrejos colocados inicialmente en CO (*grupo CO*). *Ordenadas:* porcentaje de animales. *Cuadrados blancos:* cambio CC ↔ CO: porcentaje de cangrejos hallados al menos una vez en un compartimento diferente entre 3 observaciones consecutivas. *Cuadrados negros:* permanencias en CC: porcentaje de cangrejos hallados en CC durante 3 observaciones consecutivas. *Círculos blancos:* permanencias en CO: porcentaje de cangrejos hallados en CO durante 3 observaciones consecutivas. *Abscisas:* tiempo a partir del momento en que se eleva la puerta ubicada en la partición central. Se realizaron observaciones en CC cada 5 minutos y se calculó el porcentaje para bloques de 3 observaciones consecutivas (15 minutos). Se observa que durante el primer bloque de 3 observaciones **todos** los cangrejos abandonaron el compartimento inicial.

El desempeño del *grupo-CC* se muestra en la Fig 4 donde los resultados son analizados como en la Fig 3, aunque el patrón que se observa es totalmente diferente: la correlación entre el tiempo y el porcentaje no fue significativa ni para el **cambio** ($r_s = -0.32$) ni para la **permanencia** en CC ($r_s = 0.34$), pero resultó significativa para la **permanencia** en CO ($r_s = 0.71$, $p < 0.02$). Esta aparente discrepancia entre el desempeño de los grupos es atribuible al hecho que a diferencia de los cangrejos del *grupo-CO*, sólo un número limitado de animales del *grupo-CC* comenzaban a pasar a través de la partición central durante las tres primeras observaciones. Por esta razón, se intentó otra forma de análisis: el desempeño de cada cangrejo del grupo CC fue considerado sólo a partir del primer bloque de tres observaciones en el cual el cangrejo entraba a CO. Cuando se usó este procedimiento, las curvas de la Fig 4 pasaron a ser las de la Fig 5, y nuevamente la correlación entre el tiempo y el porcentaje de cangrejos, expresado por el coeficiente de correlación de Spearman (r_s), fue significativa para el **cambio** ($r_s = -0.64$, $p < 0.05$) y para la **permanencia** en CC ($r_s = 0.83$, $p < 0.001$), pero no significativa para la **permanencia** en CO ($r_s = -0.35$).

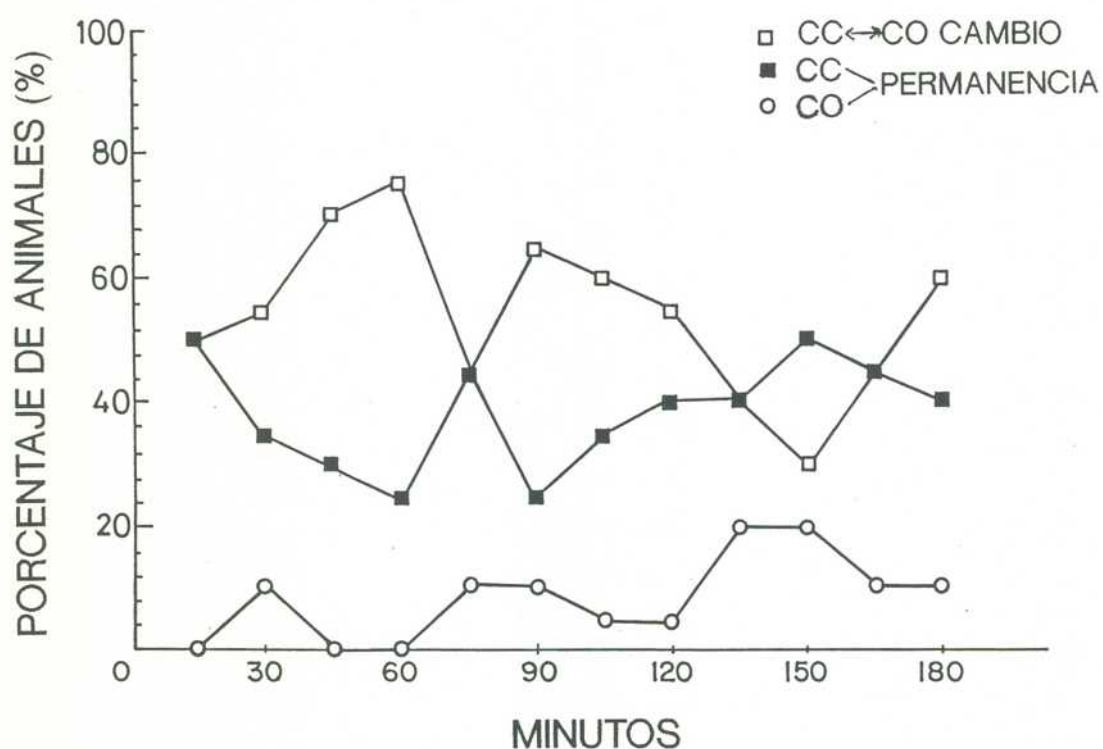


FIGURA 4: Comportamiento exploratorio de los cangrejos colocados inicialmente en CC (*grupo CC*). Ordenadas, abscisas y símbolos como en la Fig. 3. Se observa que sólo el 50% de los cangrejos abandonaron su compartimento inicial durante el primer bloque de 3 observaciones.

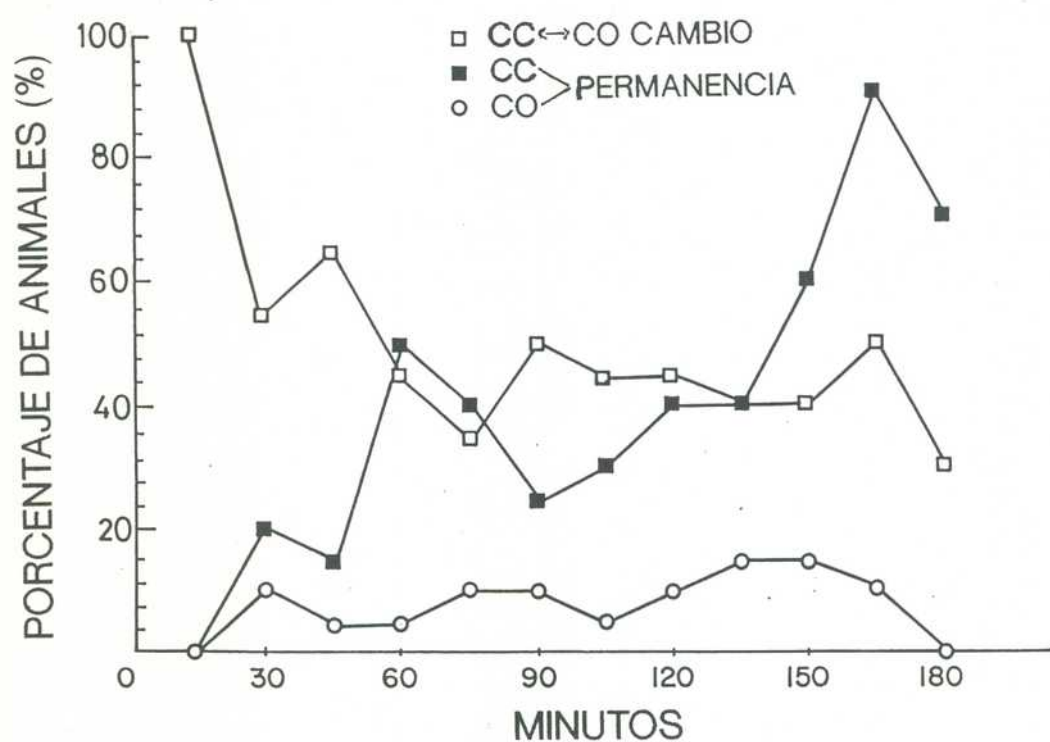


FIGURA 5: Los resultados ilustrados en la Fig. 4 están dibujados considerando como primer bloque válido de 3 observaciones, para cada animal, aquel durante el cual el cangrejo abandonaba el CC por primera vez. Los símbolos son como en las Figs 3 y 4.

De este experimento podemos sacar las siguientes conclusiones:

1.- La tendencia a pasar a través de la partición central de una a otra cámara disminuye con el transcurso del tiempo, tanto si los cangrejos comienzan la sesión en CO o en CC.

2.- La tendencia a explorar CC es mayor que a explorar CO, como resulta ilustrado por tres hechos. Primero, la latencia correspondiente a la primera entrada en CC del *grupo-CO* es menor que la primera entrada en CO del *grupo-CC*. Todos los cangrejos del *grupo-CO* entran en CC durante el primer bloque de 3 observaciones (Fig 3) mientras que sólo el 50% del *grupo-CC* entra en CO (Fig 4). Segundo, un aumento de la tendencia a permanecer en CC se correlaciona con la disminución de la tendencia a pasar a través de la partición. Tercero, el porcentaje de cangrejos con tres permanencias consecutivas en CC es mayor que con tres permanencias consecutivas en CO en cada bloque de 3 observaciones durante la sesión.

3.- Los movimientos exploratorios en CC tienden a decrecer debido a las permanencias sucesivas en esta cámara. En efecto, las observaciones a través del espejo indican que los desplazamientos dentro del CC son más cortos y menos frecuentes a medida que la sesión avanza.

Un posible mecanismo para explicar la disminución de actividad exploratoria en la doble-cámara podría ser la **habitución**, proceso por el cual el animal aprende que la exploración de la doble-cámara es indiferente. Si esta hipótesis fuera correcta, debería esperarse que se cumplieran ciertas condiciones paramétricas que definen este proceso.

III. 2 EXPERIMENTO 2

El experimento 2 tuvo el propósito de estudiar el comportamiento exploratorio de cangrejos con diferente experiencia anterior en la doble-cámara.

III. 2. 1 Método

Ciento sesenta cangrejos fueron distribuidos al azar en cuatro grupos de 40 animales cada uno, llamados: grupo *doble-cámara*, *casa*, *aislado* y *colectivo*.

Durante el Día 1 el grupo *doble-cámara* fue sometido a la sesión de entrenamiento. Cada animal era llevado desde el cuarto de mantenimiento al cuarto experimental y colocado en CO de la doble-cámara, con la puerta deslizante baja y el sistema emisor-receptor a 10 cm de la partición en CC (posición 2, Fig 1). Después de un período de adaptación de 10 min, la puerta deslizante era levantada y se registraba la latencia del cangrejo en la computadora. La puerta permanecía levantada durante 180 min y luego los cangrejos eran trasladados nuevamente a su tanque de mantenimiento. El grupo *casa* era mantenido en el mismo tanque donde se lo había colocado cuando llegaron de San Clemente; el grupo *colectivo* era llevado a un tanque de mantenimiento en el cuarto experimental, durante 190 min, y luego nuevamente al tanque inicial; y los cangrejos del grupo *aislado* se colocaban individualmente en pequeños tanques (15 x 15 x 20 cm) ubicados en el cuarto experimental, durante 190 min y luego en sus tanques de mantenimiento.

Durante el Día 2, los animales de todos los grupos eran sometidos a

una sesión de retención. Se los trasladaba al cuarto de experimentación y se los colocaba individualmente en CO de las doble-cámaras, con la puerta deslizante baja y el sistema emisor-receptor en la posición 2 (Fig 1). Después de un período de adaptación de 10 min se levantaba la puerta y se registraba la latencia del cangrejo. Cada cangrejo del grupo *doble-cámara* ocupaba la misma unidad experimental usada en el entrenamiento.

Tres cambios metodológicos importantes se realizaron respecto al Experimento 1: 1) El sistema emisor-receptor era colocado en la posición más lejana con respecto a la partición (posición 2 , Fig 1) para asegurar así que el cangrejo haya entrado completamente en CC cuando se registraba la latencia; 2) CC no era utilizado como cámara inicial ya que la tendencia a explorar CO resultaba muy baja y; 3) el desempeño de los cangrejos se estimaba únicamente a través del registro de la latencia, es decir sin observación directa de CC durante la sesión. Se eligió este procedimiento teniendo en cuenta que en el Exp 1, el valor de la latencia parecía ser una buena medida de la tendencia para explorar un compartimento. Por lo tanto, si los cangrejos se habitúan a explorar CC, debería esperarse un aumento en el valor de la latencia.

III. 2. 2 Resultados y Discusión

La figura 6 presenta la latencia media del grupo *doble-cámara* durante la sesión de entrenamiento y para los cuatro grupos durante la sesión de retención. Una inspección de esta Figura sugiere lo siguiente: Primero, los cangrejos que ya han explorado la doble-cámara, entran a CC durante el Día 2 más lentamente que durante el Día 1. Segundo, los

cangrejos que no tienen experiencia con la doble-cámara (*casa*, *aislado* y *colectivo*), entran en CC durante el Día 2 más rápido que aquellos que ya habían explorado el aparato durante el Día 1. Tercero, los cangrejos *casa*, *aislado* y *colectivo* entran en CC durante el Día 2 aproximadamente con la misma latencia, a pesar de haber tenido experiencias diferentes durante el Día 1. En efecto, un ANOVA de un factor realizado sobre todos los datos de la retención, reveló un efecto significativo de los tratamientos [$F(4,195) = 7.83$, $p < 0.005$]; y un test de Duncan de comparaciones multiples mostró una diferencia significativa ($p < 0.01$) entre la media de la retención para *doble-cámara* vs *casa*, o vs *aislado*, o vs *colectivo*, y una diferencia significativa ($p < 0.05$) entre la media del entrenamiento y la retención en el grupo *doble-cámara*. No se encontró diferencia significativa entre las medias de la retención de *casa*, *aislado* y *colectivo*.

Estos resultados de la sesión de retención están de acuerdo con la hipótesis según la cual la disminución en la actividad exploratoria (Exp 1) sería el resultado de un proceso de habituación a la doble-cámara. En efecto, el decremento en la tendencia exploratoria persistente durante al menos 24 horas, difícilmente podría ser explicado por fatiga, y además, la corta latencia de los controles (grupos *casa*, *aislado* y *colectivo*) descarta una explicación alternativa del aumento de la latencia mostrada por el grupo *doble-cámara* en términos de manoseo, cambio de contexto o aislamiento durante el entrenamiento. En otras palabras, la mayor latencia del grupo *doble-cámara* implica estímulo-especificidad, lo que según se ha dicho en la introducción representa un carácter diagnóstico de la habituación (Peeke, 1984).

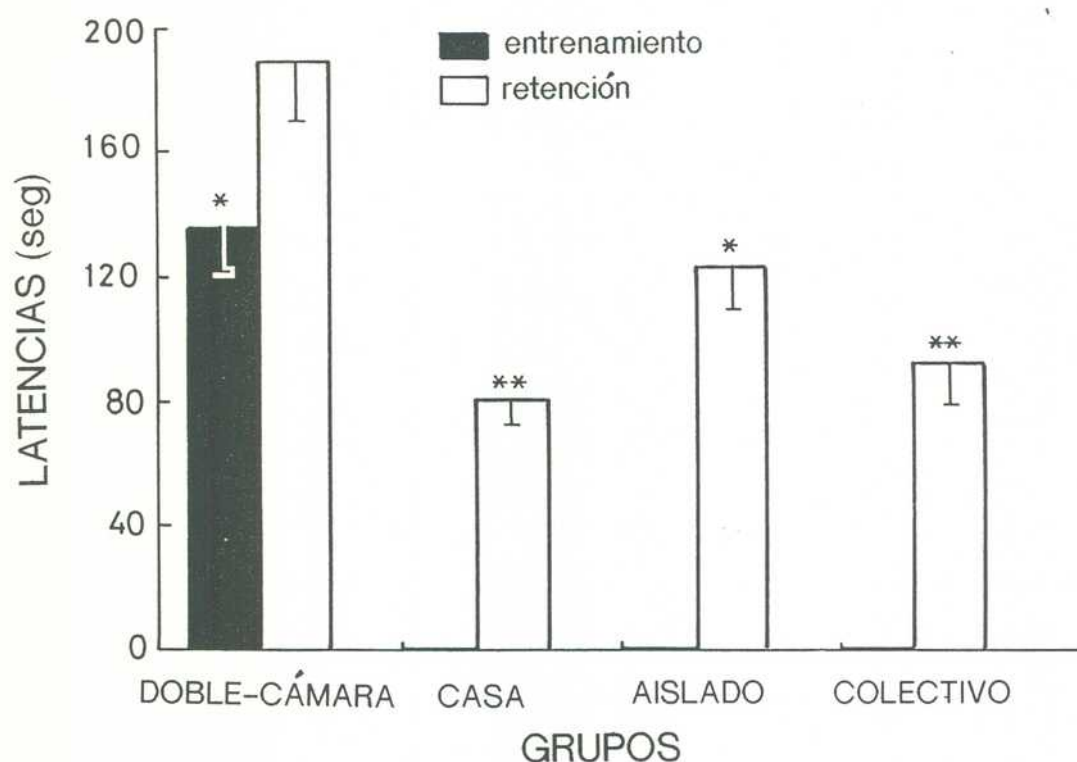


FIGURA 6: Tendencia exploratoria en la doble-cámara medida como valor de la latencia para entrar en CC por primera vez, que corresponde a cangrejos con diferente experiencia durante el día previo. *doble-cámara* exploró la doble-cámara; *casa* permaneció en su tanque original; *colectivo* se cambió a otro tanque durante el período de entrenamiento; *aislado* se colocó en pequeños tanques individuales durante el período de entrenamiento. * diferencia significativa ($p < 0.01$) entre el valor medio de la latencia de estos grupos y el del grupo *doble-cámara* durante la retención; ** diferencia significativa ($p < 0.005$) idem que el anterior (Test de Duncan). La línea vertical en las barras representa el error standard.

III. 3 EXPERIMENTO 3

En el Experimento 1 de este Capítulo, sólo se estudió el decremento de la exploración a lo largo de la sesión, mediante la observación directa de CC por el experimentador, registrando cada 5 min la presencia o ausencia del cangrejo; en el Experimento 2 de ese mismo Capítulo se midió sólo el decremento entre sesiones mediante el registro automático de la latencia, es decir, considerando el intervalo entre el momento en que la puerta se levantaba y el momento en que el haz infrarrojo era interrumpido por primera vez.

El presente Experimento se realizó con el propósito de analizar la disminución de la tendencia en la actividad exploratoria **en y entre** sesiones, usando en ambos casos el mismo método de registro automático de la latencia como medida.

III. 3. 1 Método

El método usado aquí para estimar los cambios en el comportamiento exploratorio dentro de una sesión se basa en la suposición que la latencia es una medida apropiada de la tendencia para explorar CC, es decir, una baja latencia representa una alta tendencia exploratoria y viceversa. Por lo tanto, el registro de latencias sucesivas a intervalos fijos durante una sesión, debe considerarse como una serie de pruebas tendientes a determinar la intensidad de la tendencia exploratoria en diversos momentos.

Se llevaban cuarenta cangrejos al cuarto de experimentación y se los colocaba individualmente en el CO de la doble-cámara. El sistema emisor-receptor de cada unidad estaba en CC (posición 2) y la puerta deslizante baja. Después de 10 min de tiempo de adaptación, eran levantadas las puertas de las 40 doble-cámaras, dándose comienzo al primer ensayo. Si un cangrejo permanecía en CO durante 10 min, la puerta se cerraba y se registraba una latencia igual a 600 seg (tiempo tope o "*cut-off*"). Por el contrario, si el cangrejo entraba en CC durante esos 10 min e interrumpía el haz infrarrojo, se registraba la latencia y la puerta quedaba abierta por 5 min más durante los cuales el animal podía pasar libremente de una cámara a la otra. Al final de los 5 min, si el cangrejo ya había regresado a CO, se bajaba la puerta poniendo en

funcionamiento el motor correspondiente; pero si permanecía aún en CC, se lo inducía a entrar en CO y sólo después se cerraba la puerta (el pasaje de CC a CO era fácilmente inducido mediante una pantalla opaca sobre CC). Una vez que los 40 animales estaban en CO con las respectivas puertas cerradas, se consideraba finalizado el primer ensayo. Luego de un período de reposo de 10 min (intervalo entre ensayos), comenzaba un nuevo ensayo, idéntico al primero en todos los aspectos. Una sesión comprendía cinco ensayos, al final de los cuales los animales eran llevados nuevamente a sus respectivos tanques de mantenimiento. De acuerdo a la descripción anterior, el ensayo no tenía la misma duración en todos los casos, fluctuando entre un mínimo posible de cinco minutos, si los 40 cangrejos entrasen en CC inmediatamente después de levantarse la puerta, a un máximo de quince minutos, si los 40 cangrejos entrasen inmediatamente antes de cumplirse el tope de 10 min. El experimentador podía saber que pasaba en cada una de las 40 doble-cámaras mirando el monitor de la computadora donde se registraban los siguientes eventos: 1) abertura de puerta, 2) cierre de puerta, 3) interrupción del haz infrarrojo 4) fin de los 10 min de tiempo de tope y 5) fin de los 5 min posteriores a la entrada del animal en CC.

Un grupo de cuarenta cangrejos era sometido a dos sesiones: el Día 1 a la sesión de entrenamiento y el Día 2, 24 horas más tarde, a la sesión de retención.

III. 3. 2 Resultados y Discusión

En la Fig 7 están representadas las latencias medias correspondientes a los cinco ensayos de las sesiones de entrenamiento y de retención. Un ANOVA (mixto de medidas repetidas, 2×5) realizado sobre estos datos, mostró que la latencia aumentaba a lo largo de los sucesivos ensayos [$F(4, 312) = 5.7, p < 0.005$] y que había una diferencia significativa entre sesión [$F(1, 78) = 22.6, p < 0.005$] aunque la interacción sesión \times ensayo no resultó significativa [$F(4, 312) = 1.4, p > 0.5$]. Una comparación entre las medias de cada ensayo, usando como término de error el de la interacción, indicó que la verdadera fuente de la diferencia es la porción inicial de las curvas (ensayos 1 y 2, $p < 0.005$; mientras que los ensayos 3 y 5 no presentan diferencias significativas; ensayo 4, $p < 0.05$). Un simple análisis del efecto principal, mostró que los aumentos de la latencia resultaron significativos tanto para el entrenamiento como para la retención ($p < 0.01$ y $p < 0.05$, respectivamente). Un test para la

significancia de la regresión lineal reveló una tendencia lineal altamente significativa para el entrenamiento [$F(1, 195) = 13.3, p < 0.005$] pero no para la retención [$F = 3.58, 0.1 > p > 0.05$]. Sin embargo, cuando no se tuvieron en cuenta los resultados correspondientes al primer ensayo, se vió una tendencia lineal significativa también para la retención [$F(1, 156) = 5.34, p < 0.05$].

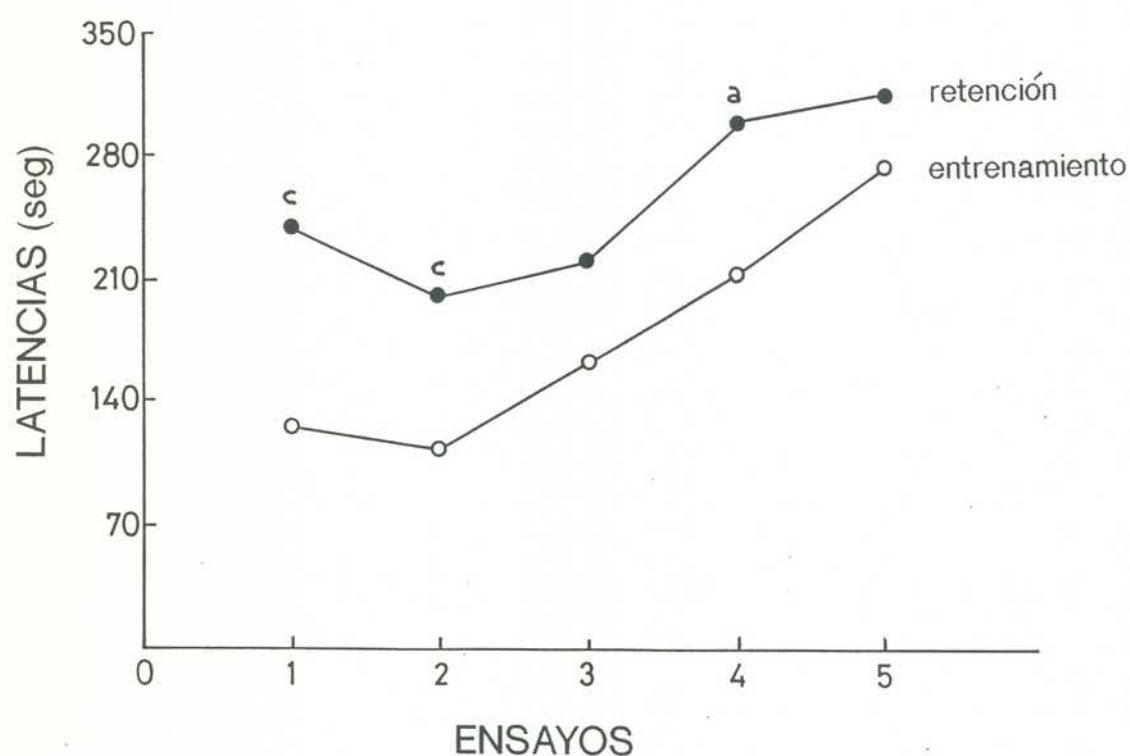


FIGURA 7: Tendencia exploratoria de cangrejos medida en términos de valores de latencias por ensayo durante los 5 ensayos, tanto en el entrenamiento como en la retención. a: $p < 0.05$; c: $p < 0.005$ (Test de Duncan)

Resultados similares fueron encontrados en todos los experimentos del presente trabajo cuando la tendencia exploratoria era determinada por la medición de las sucesivas latencias. De estos resultados se pueden sacar las siguientes conclusiones.

1.- La tendencia exploratoria disminuye durante los 5 ensayos tanto en la sesión de entrenamiento como en la de retención, aunque se ve una pequeña pero consistente disminución en la latencia en el ensayo 2 (esto es, un aumento en la exploración) durante ambas sesiones.

2.- El nivel de exploración es más bajo en la retención que en el entrenamiento. La mayor diferencia entre sesión se encontró cuando se compararon las latencias correspondientes a los primeros dos ensayos de cada sesión.

Estos hallazgos podrían ser explicados en términos de la teoría dual de la habituación (Groves and Thompson, 1970) como casos de habituación a la exploración de corto y largo término junto con una tendencia hacia una sensibilización inicial transitoria.

CAPÍTULO IV:

CONDICIONAMIENTO INSTRUMENTAL APETITIVO

IV. 1 EXPERIMENTO 1

Este experimento se diseñó con el propósito de comprobar si se puede obtener una modificación en la tendencia exploratoria a corto o largo término cambiando la consecuencia de la exploración

IV. 1. 1 Método

El procedimiento fue el mismo que en el Experimento 3 del Capítulo III. Se ofreció a los cangrejos un pequeño trozo de pescado (40-60 mg) colocado en la posición * en CC (Fig 1), esto es, inmediatamente detrás de una delgada tira de plástico. A diferencia de los experimentos previos, sólo el CO tenía su piso cubierto por una capa de agua de 0.5 cm de espesor. Doscientos ochenta cangrejos fueron distribuidos en siete grupos de 40 animales cada uno: *alimento*, *control*, *control+alimento*, *doble-cámara*, *aislado*, *colectivo* y *casa*. Los primeros tres grupos tuvieron dos sesiones de 5 ensayos cada uno con un intervalo entre sesiones de 24 horas, o sea el entrenamiento se hizo en el Día 1 y la retención en el Día 2. Al grupo *alimento* se le ofreció el refuerzo (trozo de pescado) en cada ensayo de la sesión de entrenamiento; el grupo *control* no tuvo refuerzo; y el grupo *control+alimento* era idéntico al grupo *control* pero recibió cinco trozos de pescado después del entrenamiento en los tanques de mantenimiento. Los grupos *doble-cámara*, *casa*, *colectivo* y *aislado* tuvieron durante el Día 1 un tratamiento similar al del grupo respectivo con el mismo nombre en el Exp 2 (Capítulo III), es decir, el grupo *doble-cámara* permaneció durante 190 min en la doble-cámara (10 min de adaptación en CO y 180

min explorando libremente ambos compartimentos); el grupo *casa* era mantenido en el mismo tanque donde se los había colocado cuando llegaron; el grupo *colectivo* era llevado a un tanque de mantenimiento en el cuarto experimental, durante 190 min y luego retornado a su tanque de mantenimiento inicial; y los cangrejos del grupo *aislado*, colocados en pequeños tanques en el cuarto experimental, durante 190 min y luego devueltos a su tanque inicial. Durante el Día 2 todos los grupos eran sometidos a la misma sesión de retención que consistía de 5 ensayos sin alimento.

Durante el Día 1 los grupos *alimento*, *control*, *control+alimento* y *doble-cámara* fueron corridos simultáneamente en las doble-cámaras, pero como sólo había 40 unidades, se necesitaron cuatro replicaciones para completar cada grupo. Los cangrejos del mismo grupo ocupaban las mismas 10 unidades en cada replicación. Todas las unidades se limpiaron cuidadosamente al final de la última replicación del Día 1, pero no se realizó una limpieza entre las replicaciones.

IV. 1. 2 Resultados y Discusión

La Fig 8 presenta las latencias medias registradas durante el entrenamiento para los tres grupos que tuvieron una sesión de 5 ensayos durante el Día 1. Un ANOVA (mixto de medidas repetidas, 3×5) realizado sobre estos datos reveló una interacción significativa grupo \times ensayo [$F(8, 468) = 3.5, p < 0.005$] pero la diferencia entre grupos estuvo apenas por debajo de la significancia [$F(2, 117) = 2.4, 0.10 > p > 0.05$]. Una comparación entre las medias para cada ensayo, usando como término de error el de la interacción, no mostró diferencias significativas, en los

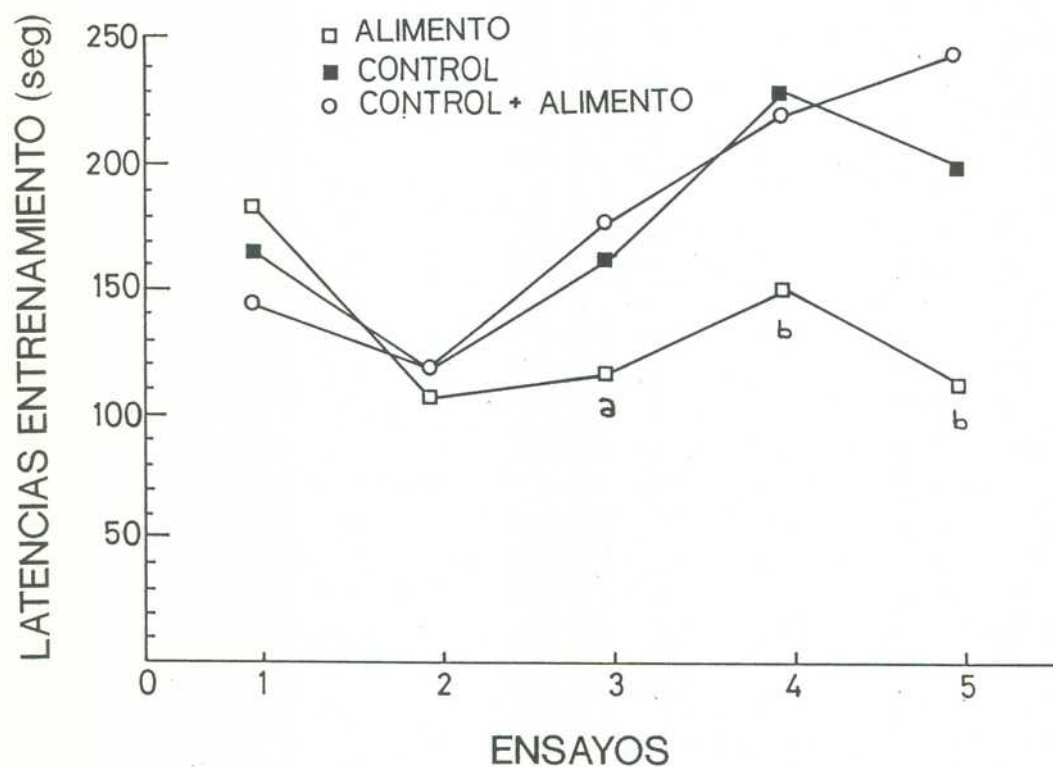


FIGURA 8: Tendencia exploratoria durante una sesión de entrenamiento de 5 ensayos. *Cuadrados blancos:* los cangrejos eran reforzados con un trozo de pescado en cada ensayo (*alimento*). *Cuadrados negros:* los cangrejos no eran reforzados (*control*). *Círculos blancos:* los cangrejos comían inmediatamente después de la sesión, en las cubas de mantenimiento (*control + alimento*). a: $p < 0.05$; b: $p < 0.01$ (Test de Duncan)

ensayos 1 y 2, para ninguna comparación entre grupos; en el ensayo 3 hay diferencia significativa sólo para *alimento* vs *control+alimento* ($t = 2.5$, $p < 0.05$); y en los ensayos 4 y 5 hay diferencias altamente significativas para *alimento* vs *control* y para *alimento* vs *control+alimento* ($p < 0.01$). Las latencias medias del grupo *alimento* tienden a disminuir a lo largo del entrenamiento pero un test de significancia de regresión lineal no revela una tendencia lineal significativa [$F(1, 195) = 3.54$, $0.10 > p > 0.05$]. Por el contrario, tanto *control* y *control+alimento* mostraron una tendencia lineal positiva, significativa ($F = 5.3$, $p < 0.025$; y $F = 13.04$, $p < 0.005$, respectivamente).

Por lo tanto, cuando los animales recibían comida en cada ensayo, no se observaba una disminución de la tendencia exploratoria durante la sesión de entrenamiento. Vale la pena subrayar que el pequeño trozo de pescado era tomado por el cangrejo cada vez que entraba en CC.

Durante el Día 2, los siete grupos presentaban una tendencia a aumentar los valores de las latencias (esto es a disminuir la exploración) a lo largo de la sesión de retención. Se encontró una regresión lineal significativa para cada curva [$F(1,195) = 4.0$, $p < 0.05$]. Las comparaciones entre grupos para las tendencias exploratorias durante la retención, fueron realizadas considerando sólo los datos de los primeros dos ensayos, ya que las posibles diferencias resultaron ser más claras en la porción inicial de las curvas. En efecto, la latencia media para cada grupo mostrado en la Fig 9 fue obtenida promediando los valores de las latencias acumuladas por animal durante el primer bloque de dos ensayos. Un ANOVA de un factor realizado sobre estos datos reveló un efecto del tratamiento estadísticamente significativo [$F(9,390) = 11.2$, $p < 0.005$]. Un test de Duncan mostró: 1) diferencia significativa entre la media de la retención del grupo *control* y la de lo grupos *aislado*, *colectivo*,

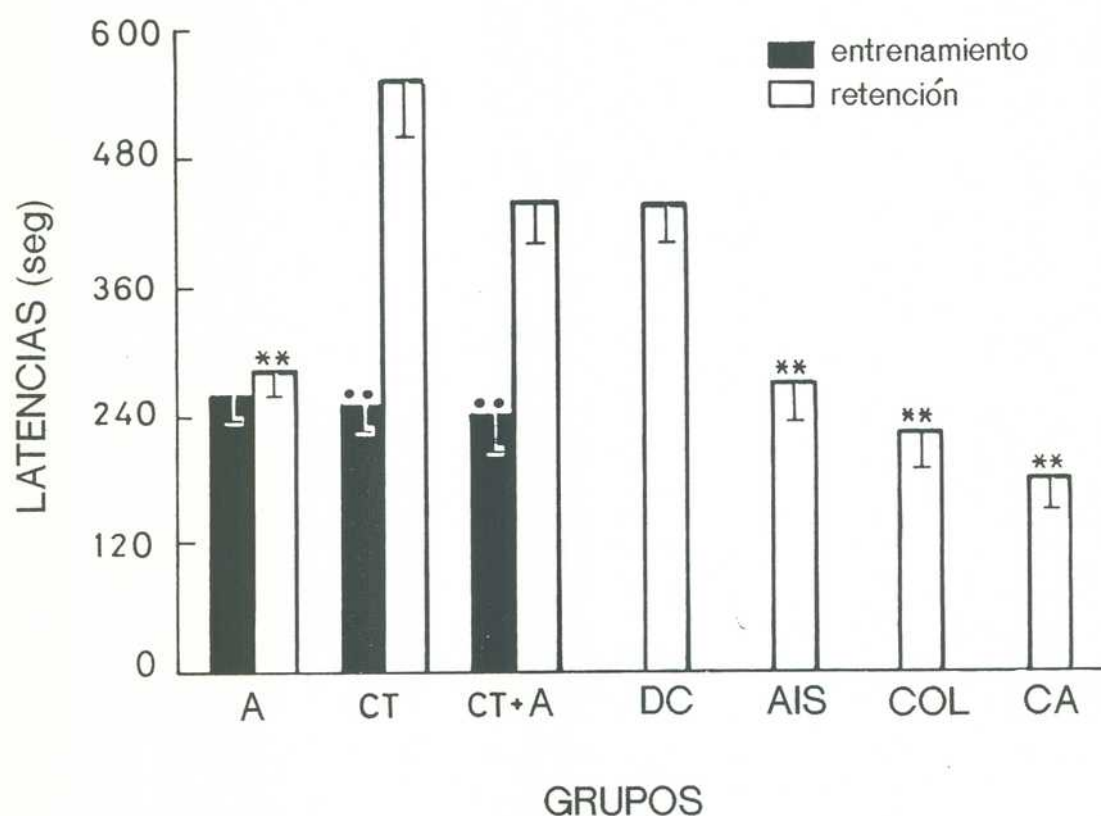


FIGURA 9: Tendencia exploratoria en la doble-cámara, de cangrejos con experiencias diferentes durante el día previo. *alimento* (A), *control* (CT), *control + alimento* (CT + A) como en la Fig 8; *doble-cámara* (DC), *aislado* (AIS), *colectivo* (COL) y *casa* (CA) como en la Fig 6. Cada barra representa el promedio de la suma de las latencias, por animal, en los dos primeros ensayos. ** diferencia significativa ($p < 0.005$) entre esta latencia media y la del grupo *control* (CT) durante la retención; •• diferencia significativa ($p < 0.005$) entre este valor de la latencia media en el entrenamiento y la del mismo grupo durante la retención (Test de Duncan). La línea vertical sobre las barras indica en error standard.

casa y *alimento* ($p < 0,005$; doble asterisco en las barras blancas Fig 9); 2) no hay diferencias significativas entre la media de la retención del *control* y las del *control+alimento* y *doble-cámara*; 3) diferencia significativa entre las medias del entrenamiento y de la retención del *control* y también entre las del *control+alimento* ($p < 0,005$; doble punto en las barras negras, Fig 9); y 4) no hay diferencia significativa entre las medias del entrenamiento y la retención correspondientes al grupo *alimento*.

De estos resultados se pueden sacar las siguientes conclusiones:

1.- Los animales sometidos a dos sesiones exploratorias de 5 ensayos en la doble-cámara, separados por un intervalo entre sesiones de 24 horas, muestran un decremento en la actividad exploratoria en y entre sesiones medida por el registro sucesivo de las latencias (*control*, Figs 8 y 9). La disminución de la exploración entre sesiones (aumento de la latencia) del grupo control es explicado por la experiencia anterior en la doble-cámara. Las latencias prolongadas en la retención del grupo *doble-cámara* descartan una explicación basada en el efecto que sobre los cangrejos del grupo *control* pudo haber causado el ser, a veces, empujados para volver a CO en el entrenamiento; y las bajas latencias de los grupos *aislado*, *colectivo* y *casa*, descartan una explicación basada en el manejo, cambio de contexto o aislamiento de los cangrejos del grupo *control* durante el Día 1.

2.- Si los cangrejos son recompensados con comida en la doble-cámara durante la sesión de 5 ensayos del entrenamiento, no se observa la disminución de la exploración ni durante la sesión ni entre sesiones (*alimento*, Figs 8 y 9). Las cortas latencias del grupo *alimento*

durante la retención, esto es el aumento de la tendencia exploratoria entre sesiones, está producida por la experiencia anterior positiva en la doble-cámara pero no por el mero hecho de haber sido alimentados (*control + alimento*).

3.- El aumento de la tendencia exploratoria debido a que los cangrejos han recibido comida en la doble-cámara durante el entrenamiento, desaparece en los ensayos de la retención, esto es, tiene lugar una extinción del aumento en la tendencia exploratoria. Este hecho es ilustrado en la Fig 10 donde se presentan las curvas del grupo *alimento* en el entrenamiento y en la retención, mientras las latencias medias tienden a disminuir durante el entrenamiento, ellas tienden a aumentar durante la retención.

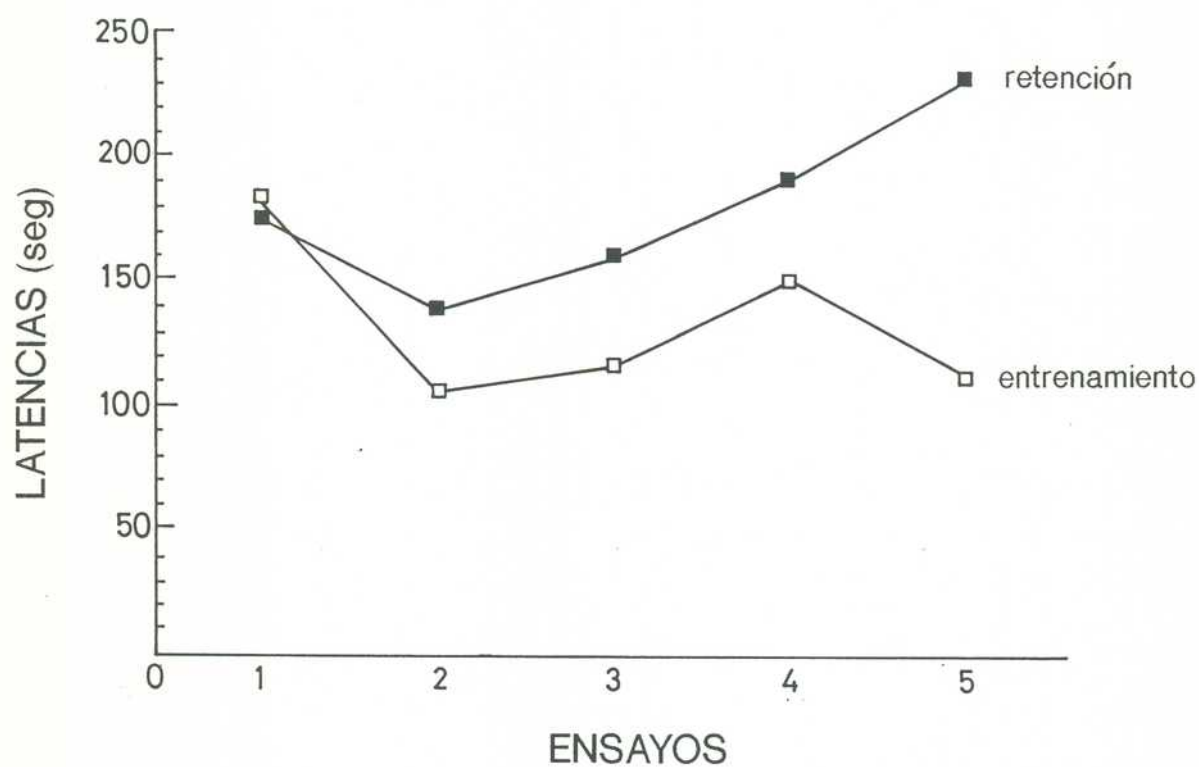


FIGURA 10: Tendencia exploratoria durante los 5 ensayos del entrenamiento y de la retención (24 horas de intervalo entre sesiones) en un grupo de cangrejos reforzados durante el entrenamiento (Grupo *alimento*).

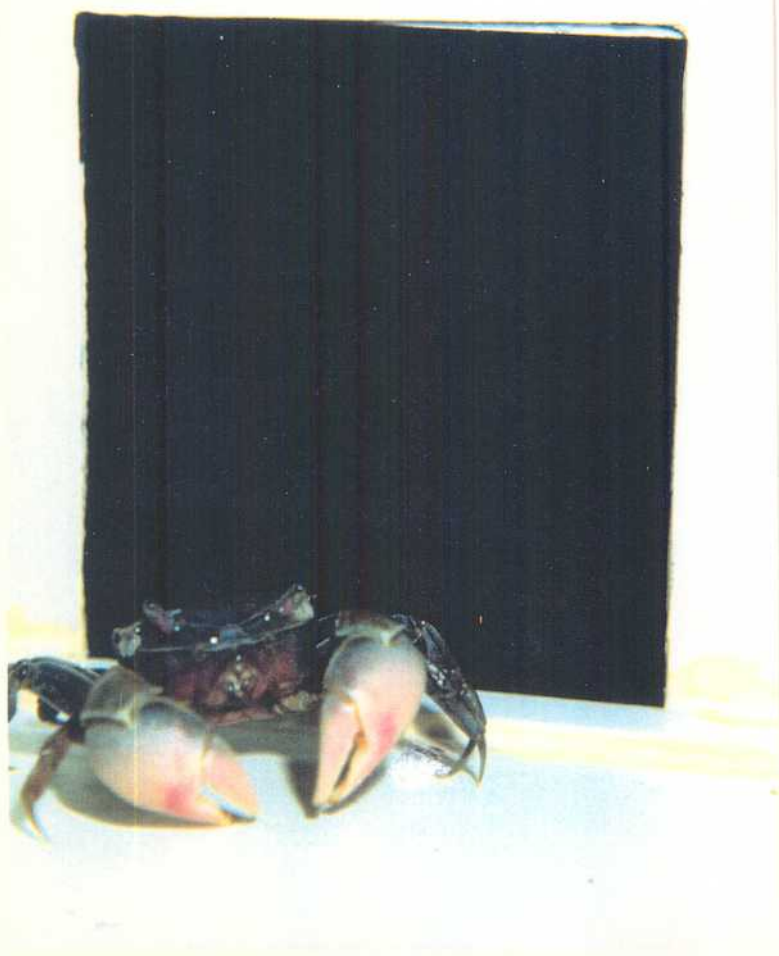
Observaciones directas de la actividad locomotora de los cangrejos en CC revelaron dos tipos de comportamientos claramente diferentes: el **comportamiento caminador** habitual, en el cual los pereiópodos se mueven activamente mientras el propodus de los quelípedos apenas tocan el sustrato, por lo que estos apéndices parecen jugar un papel subordinado durante los desplazamientos (Fig 11 a); y por otra parte, el **comportamiento apetitivo** o con más propiedad fase apetitiva de la alimentación (Zimmert-Faust 1987), en la cual los quelípedos están extendidos y son usados para picar el sustrato (Fig 11 b). Este movimiento de los quelípedos puede ser fácilmente detectado por la observación directa, y aún escuchado, cuando se produce sobre un piso plástico como el de la doble-cámara. Durante la retención, todos los cangrejos muestran un comportamiento caminador en CC pero sólo los cangrejos del grupo **alimento** despliegan un comportamiento apetitivo aunque no haya señales de alimento durante esa sesión. Este hecho apoyaría el punto 3 de las conclusiones arriba enunciadas, especialmente, la hipótesis que los cangrejos alimentados en CC, en el entrenamiento, aprendían la consecuencia positiva de su actividad exploratoria en la doble-cámara y por lo tanto, la habituación de la exploración a largo término no se manifiesta en la retención.

Sin embargo, esta interpretación de los datos podría ser discutida en dos puntos. Primero, los cangrejos del grupo **alimento** eran ubicados en la misma unidad experimental el Día 1 y el Día 2, así pues un rastro del olor del alimento podría persistir después de 24 horas, aún cuando las doble-cámaras eran lavadas y secadas cuidadosamente después del último experimento del Día 1. Por lo tanto, las bajas latencias del grupo **alimento** así como el comportamiento apetitivo a menudo desplegado por animales del grupo, podría deberse a la presencia de rastros de olor del alimento en la doble-cámara durante la sesión de retención.



FIGURA 11:

a) comportamiento caminador



b) comportamiento apetitivo

Segundo, las unidades ocupadas por el grupo *alimento* no eran limpiadas entre ensayos durante la sesión de entrenamiento y a menudo se desplegaba el comportamiento apetitivo aún antes que la puerta deslizante se levantara. Por lo tanto, aunque la primera objeción resultara incorrecta, la naturaleza del refuerzo no sería clara. En efecto, se podría argumentar que los cangrejos del grupo *alimento* no aprenden la consecuencia positiva de su actividad exploratoria sino que asocian la doble-cámara con una señal de comida presente durante el entrenamiento que provoca un comportamiento apetitivo.

IV. 2 EXPERIMENTO 2

Este experimento se diseñó con el propósito de poner a prueba las dos interpretaciones alternativas consideradas al final de la sección anterior.

Experimento 2 a

IV. 2. 1 Método

Se adoptó un procedimiento similar al del Experimento 1. Ciento sesenta cangrejos fueron asignados al azar en igual número para cada celda de un diseño factorial 2×2 , siendo los factores *alimento* (*alimento*: un trozo de pescado en CC en cada ensayo del entrenamiento; *control*: sin alimento en la doble-cámara) y la *unidad experimental* (*igual*: la misma doble-cámara fue ocupada en el entrenamiento y en la retención; *diferente*: los cangrejos entrenados con comida ocuparon las unidades que habían sido utilizadas con controles durante el entrenamiento y viceversa). De esta manera, se formaron

cuatro grupos: *alimento-igual*, *alimento-diferente*, *control-igual* y *control-diferente*.

IV. 2. 2 Resultados y Discusión

La Fig 12 muestra la media de los valores de las latencias acumuladas por animal durante los dos primeros ensayos de la retención. Un ANOVA de un factor realizado con estos datos reveló un efecto significativo del tratamiento [$F(4, 156) = 22.4$, $p < 0.005$]. Un test de Duncan para comparaciones múltiples demostró diferencias significativas para *control-igual* vs *alimento-igual* y para *control-igual* vs *alimento-diferente* ($p < 0.005$) pero no para las comparaciones entre los grupos *control* o entre los grupos *alimento*. Ambos grupos *alimento* desplegaban un comportamiento apetitivo en el entrenamiento y en la retención, pero en los *controles*, este comportamiento no se observó en ninguna de las dos sesiones.

Las bajas latencias en los dos primeros ensayos de la retención que muestran los cangrejos previamente entrenados con alimento no puede explicarse por *claves olfativas* que persisten 24 horas después del entrenamiento. Tampoco el comportamiento apetitivo desplegado por esos cangrejos durante la sesión de retención podría ser explicado por esa persistencia. Por lo tanto, estos resultados están de acuerdo con la hipótesis que los animales entrenados con alimento adquieren durante el entrenamiento una experiencia positiva en la doble-cámara, la que recuerdan 24 horas después, induciendo así un nivel de exploración más alto que el de los controles. Además, estos hechos indican que las pequeñas diferencias entre las unidades experimentales no representan un factor crítico para la retención.

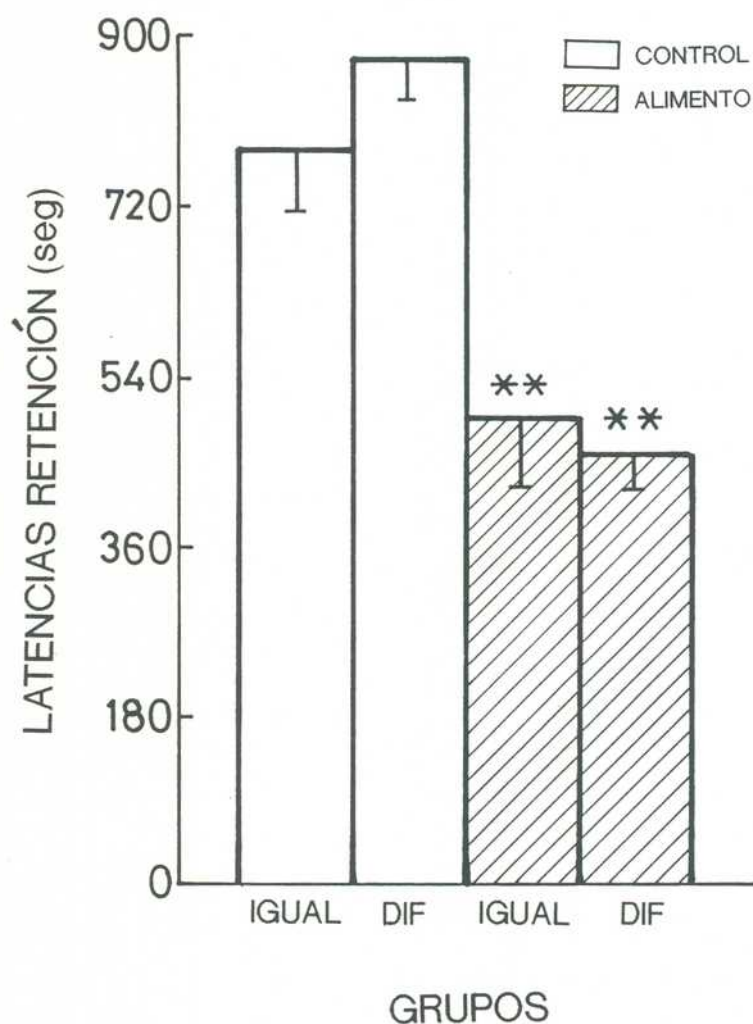


FIGURA 12: Experimento cruzado en la doble-cámara. Grupo **IGUAL**: los cangrejos ocuparon las mismas unidades en el entrenamiento y en la retención; Grupo **DIF**: los cangrejos entrenados con alimento ocuparon en el día de la retención las unidades destinadas a los controles durante el entrenamiento, y viceversa. Cada barra representa el promedio de la suma de las latencias, por animal, en los dos primeros ensayos de la retención. ** diferencia significativa ($p < 0.005$) entre esta latencia media y la del grupo *control-igual*.

Experimento 2 b

IV. 2. 3 Método

Se introdujeron dos cambios en el procedimiento respecto al Exp 2 a.

a) Se colocó un trozo de pescado (40-60 mg) en el agua que cubría el piso del CO durante una hora y retirado 10 min antes de colocar los cangrejos para la sesión de entrenamiento. Esta manipulación no se realizó en la sesión de retención.

b) El entrenamiento y la retención se llevaron a cabo en las mismas unidades experimentales. Se trabajó con dos grupos de 40 cangrejos cada uno: un grupo *alimento* con un trozo de pescado ofrecido en cada ensayo del entrenamiento y un grupo *control* sin recompensa.

IV. 2. 4 Resultados y Discusión

Durante la sesión de entrenamiento ambos grupos mostraron comportamientos apetitivos, pero la tendencia exploratoria en el transcurso de los ensayos difiere entre los grupos, de la manera habitual (Fig 13). En efecto, mientras las latencias medias del grupo *control* aumentaban a lo largo de la sesión siguiendo una tendencia lineal significativa [$F(1, 160) = 11.82, p < 0,005$], aquellas del grupo *alimento* tendían a disminuir aunque el test de regresión lineal mostró que esa tendencia no era significativa ($F = 0,65$).

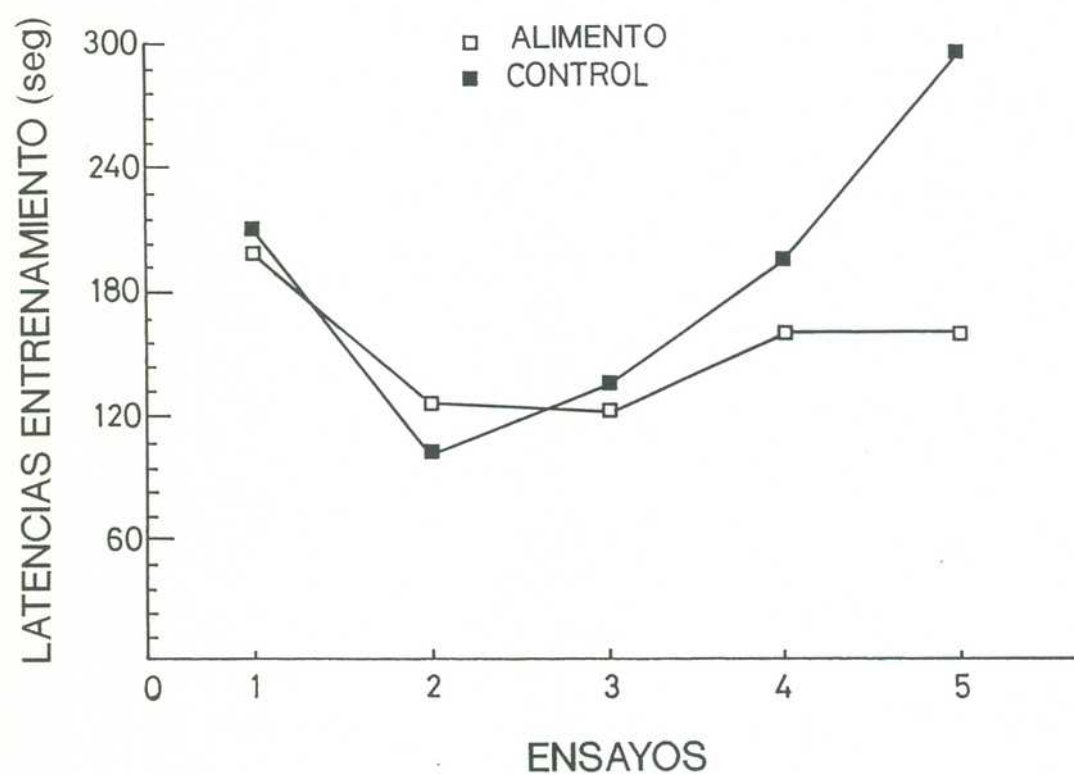


FIGURA 13: Tendencia exploratoria durante 5 ensayos del entrenamiento con olor del alimento. Grupo *control* y grupo *alimento*.

La Fig 14 presenta la media de la latencia acumulada por animal para los primeros dos ensayos del entrenamiento (barras negras) y de la retención (barras blancas). Un ANOVA de un factor realizado sobre estos datos reveló un efecto significativo del tratamiento [$F(4, 156) = 27.0, p < 0.005$]. Un test de Duncan mostró diferencias significativas para las medias de la retención del grupo *control* vs cada uno de las otras tres medias ($p < 0.005$) y diferencias no significativas entre estos tres valores. En otras palabras, los animales entrenados con alimento tuvieron durante los primeros dos ensayos de la retención un alto nivel de exploración. Durante la sesión de retención sólo los cangrejos entrenados con comida exhibieron un comportamiento apetitivo.

Por lo tanto, sólo los cangrejos entrenados con alimento mostraron una alta tendencia exploratoria después de un intervalo entre sesiones de 24 horas, a pesar de que tanto los controles como los entrenados con alimento habían estado durante toda la primera sesión en un ambiente impregnado con olor. Además, las diferencias entre las curvas de latencias correspondientes a los controles y entrenados durante la primera sesión no se modifica por la presencia de claves olfativas. Así, la captura efectiva y la ingestión del alimento en la doble-cámara durante el entrenamiento, y no el mero olor del alimento, parece ser el factor crítico que induce a un aumento en la tendencia exploratoria que persiste al menos por 24 horas.

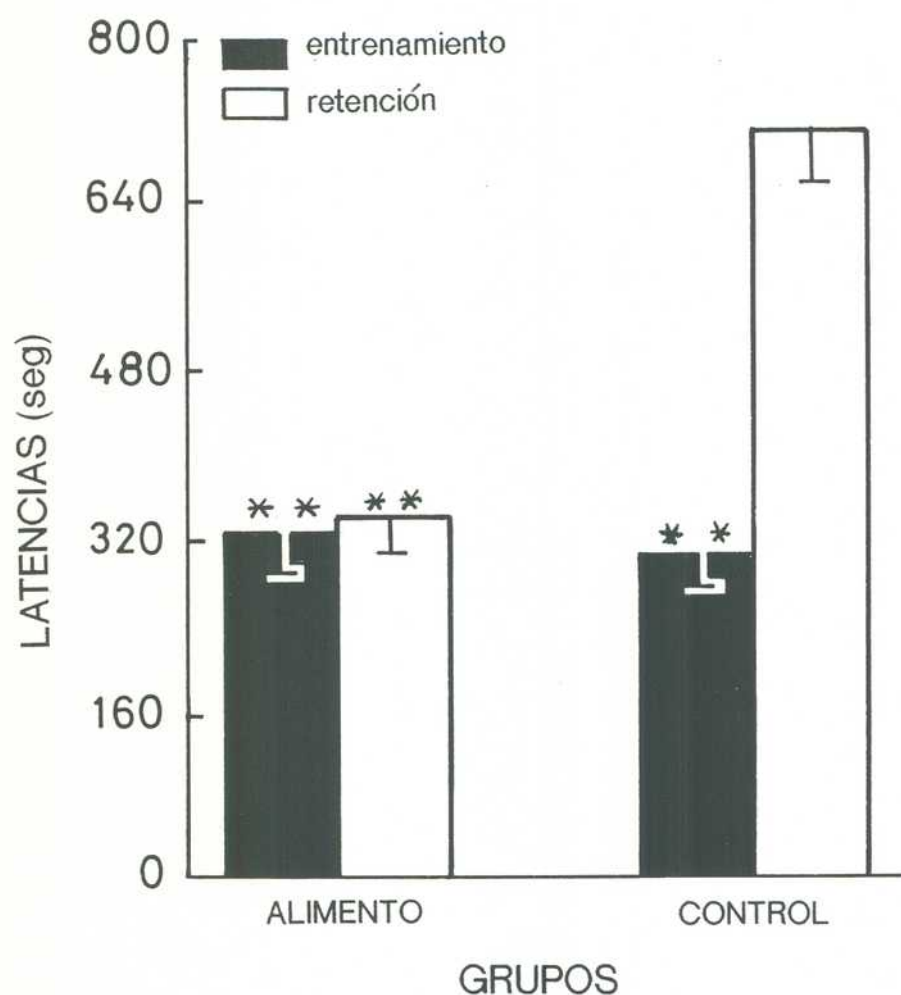


FIGURA 14: Tendencia exploratoria durante el entrenamiento y la retención de los grupos de la Fig 13. Cada barra representa el promedio de la suma de las latencias, por animal, de los dos primeros ensayos. ** diferencia significativa ($p < 0.005$) entre esta latencia media y la del día de la retención del grupo CONTROL.

IV. 3 EXPERIMENTO 3

En el transcurso de este Capítulo, el valor de la latencia de pasaje CO→CC ha sido considerado una medida de la tendencia a explorar la doble-cámara. De ahí entonces, que las latencias cortas en la retención presentadas por cangrejos entrenados con alimento en CC (Exp 1 y 2), se han interpretado como la persistencia de un aumento *generalizado* en la tendencia a explorar la doble-cámara, debido a un condicionamiento. Sin embargo, podría ofrecerse una interpretación diferente de estos resultados. En efecto, podría argüirse que la consecuencia positiva de la exploración durante el entrenamiento, no produce un aumento generalizado de la tendencia exploratoria sino la adquisición de un comportamiento dirigido a un objetivo (*goal tracking*, Boakes, 1977). En otros términos, el animal tendería a ir directamente al lugar, dentro de la doble-cámara, donde obtuvo el refuerzo. Si esta última interpretación fuese cierta, cangrejos reforzados en CO durante el entrenamiento deberían mostrar una latencia (CO→CC) mayor en la retención que aquellos reforzados en CC. El propósito de este experimento es poner a prueba esta suposición.

IV. 3. 1 Método

Ciento diecisiete cangrejos fueron distribuidos al azar en tres grupos de 39 animales cada uno: CC, CO y Control. El grupo CC recibía el refuerzo en el compartimento iluminado durante cada ensayo del entrenamiento, y en la forma habitual, es decir, un pequeño trozo de pescado era colocado en la posición * en CC (Fig 1). El grupo CO recibía el refuerzo en el compartimento oscuro, inmediatamente después de cada

ensayo del entrenamiento, es decir, tan pronto comenzaba el intervalo entre ensayos. El grupo Control, no recibía refuerzo. En todos los demás aspectos, el procedimiento experimental fue idéntico al del Experimento la de este Capítulo, inclusive en el hecho de que todos los animales iniciaban cada ensayo en CO.

IV. 3. 2 Resultados y Discusión

El rendimiento de los animales durante el entrenamiento se ilustra en la Figura 15. Una simple observación de esta Figura sugiere que el comportamiento de CO fue sustancialmente diferente de los de CC y Control, los que a su vez no parecen haber diferido entre sí. Esa impresión resultó confirmada por un ANOVA de un factor realizado sobre esos datos, el que demostró un efecto significativo del tratamiento [$F(2, 114) = 12.11$, $p < 0.005$], y por un test de Duncan, el que reveló una diferencia significativa para CO vs Control y para CO vs CC ($p < 0.001$), pero no para CC vs CO.

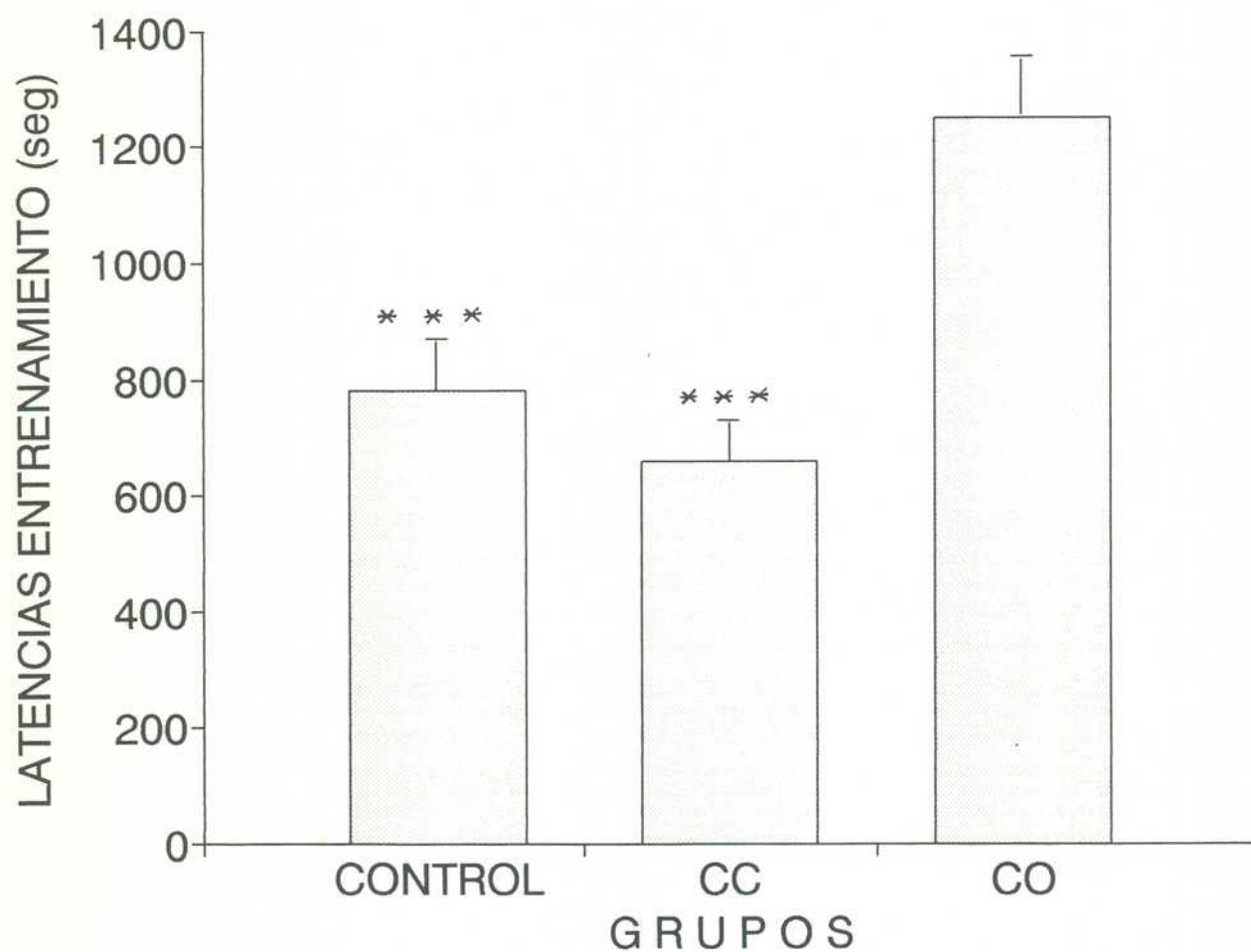


FIGURA 15: Rendimiento de los animales durante el entrenamiento. **CC:** reforzado en CC durante cada ensayo; **CO** reforzado en CO inmediatamente después de cada ensayo; **CONTROL** no recibía refuerzo.

*** diferencia significativa ($p < 0.001$) (Test de Duncan)

La relación entre los grupos, respecto a los valores totales de latencia durante la retención (Fig 16), fue muy diferente a aquel presentado para el entrenamiento (Fig 15). Un ANOVA de un factor sobre los datos de la retención, demostró que no hubo diferencia significativa para la comparación **CO vs Control** (alfa = 0.05), pero si para **CO vs CC** ($p < 0.01$) y para **Control vs CC** ($p < 0.05$).

En la Figura 17 se puede apreciar la diferencia entre los grupos respecto al curso de los valores de las latencias durante la retención. El análisis de esta Figura, sugiere también que hubo un comportamiento similar para **CO y Control** a través de toda la sesión, claramente diferente de aquel de **CC**. Un ANOVA (mixto de medidas repetidas, 3×5) realizado sobre estos datos, reveló un efecto significativo para tratamiento y ensayos [$F(2, 114) = 4.74$, $p < 0.025$; $F(4, 456) = 19.35$, $p < 0.005$; respectivamente], pero no para la interacción tratamiento \times ensayos. Un análisis para cada ensayo se hizo a través de un test de Duncan, demostrándose que las diferencias entre **CO y Control** nunca fueron significativas ($p > 0.05$), mientras que la comparación **CO vs CC** o **Control vs CC** dió una diferencia significativa en la media de las latencias para todos los ensayos excepto el primero.

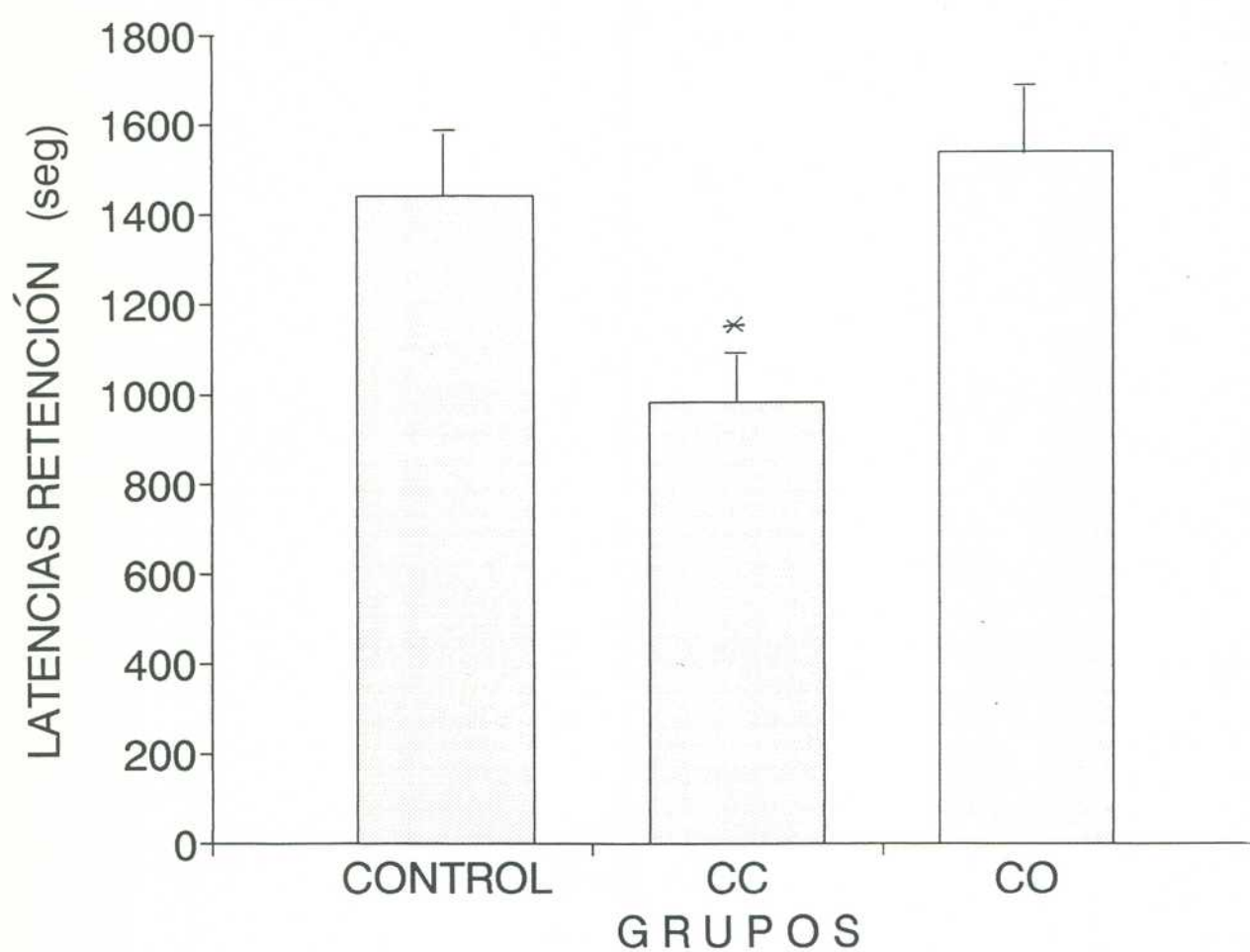


FIGURA 16: Rendimiento durante la retención de los grupos de la Fig 15. * diferencia significativa ($p < 0,01$) (Test de Duncan)

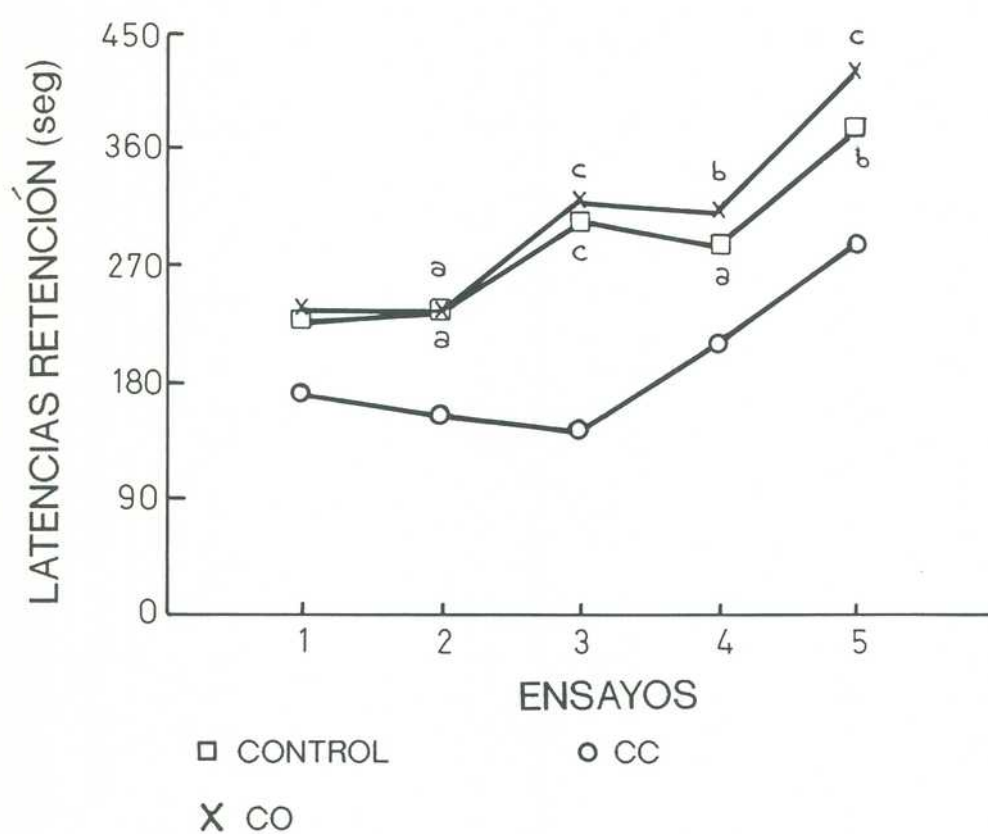


FIGURA 17: Curso de los valores de las latencias, durante la retención, de los mismo grupos de la Fig 15. a: $p < 0.05$; b: $p < 0.01$; c: $p < 0.001$ (Test de Duncan)

Los resultados más destacables de este Experimento pueden resumirse en los siguientes puntos.

1.- Los animales reforzados en CO mostraron latencias mayores que las de CC, tanto en la sesión de entrenamiento como en la de retención.

2.- Los animales reforzados en CO presentaron durante el entrenamiento latencias mayores que las de los controles, pero durante la retención ambos grupos de cangrejos se comportaron de manera similar respecto a los valores de latencia.

El primer resultado indica que la consecuencia positiva de la exploración durante el entrenamiento, no produce un aumento generalizado de la tendencia exploratoria, sino la adquisición de un comportamiento dirigido a un objetivo, de tal manera que durante la retención, el animal tiende a ir directamente hacia CC si allí había sido reforzado o tiende a permanecer en CO si en ese compartimento había recibido el alimento. Respecto al segundo resultado, cabe destacar que si se acepta a la latencia CO→CC como una medida de la tendencia exploratoria, debería concluirse que CO tuvo durante el entrenamiento una respuesta exploratoria mucho menor que la del Control, a pesar de lo cual ambos grupos mostraron durante la retención un mismo nivel exploratorio, es decir, estaban aparentemente habituados.

Sin embargo, esta manera de interpretar los resultados de la presente Tesis, merece una discusión especial. En efecto, entender que el condicionamiento instrumental "corrige" la habituación de la exploración, ya sea suprimiéndola cuando el refuerzo es dado en CC, o acentuándola cuando el refuerzo es dado en CO, implica negar la posibilidad de que la

habituaación de la exploración sea un fenómeno independiente y coexistente con el condicionamiento. No obstante, esta impresión sería sólo la consecuencia de haberse usado una misma medida, la latencia CO→CC, para evaluar los niveles de dos actividades distintas: la exploración y la locomoción dirigida hacia un objetivo. En experimentos donde estas actividades podían expresarse a través de diferentes items de comportamiento, ha sido posible demostrar que ambos fenómenos de aprendizaje no son competitivos ni aditivos sino que pueden darse simultáneamente. En efecto, en el paradigma de hallazgo de agua en una **arena de exploración** (Tenen, 1965; Le Moal y col., 1984)), las ratas adquirirían simultáneamente una respuesta exploratoria habituada a la arena y un condicionamiento a una fuente de agua colocada en un lugar determinado de esa arena. La discriminación entre los niveles de ambas respuestas era posible, ya que la tendencia exploratoria se estimaba por el número de levantamientos de las patas anteriores (*rearings*) (Rodgers y col., 1984), mientras que el aprendizaje de la fuente de agua, por el tiempo empleado en llegar a la misma. En nuestro caso, no se han cuantificado dos items diferentes de comportamiento para evaluar el grado de cada aprendizaje, pero la distinta naturaleza de la exploración y de la locomoción hacia la fuente de alimento, resulta evidenciada por el hecho de que sólo esta última está frecuentemente acompañada por un comportamiento apetitivo anticipado (Fig 11 b). Además, la coexistencia de la habituación de la exploración y el condicionamiento instrumental en los experimentos con el cangrejo, se deduce comparando los resultados obtenidos en la retención por CC (grupo reforzado en CC durante el entrenamiento), con aquellos de CO (grupo reforzado en CO) y del Control (grupo no reforzado) (Figura 17). Los tres grupos muestran una significativa tendencia a aumentar las latencias. Con respecto a CC, lo más obvio es interpretar esa tendencia como un caso de extinción, es

decir, la repetición de ensayos sin refuerzos se manifiesta en una disminución de la locomoción dirigida hacia la fuente; pero en relación a CO, la extinción de su condicionamiento al lado oscuro, tendría que expresarse por un aumento de la exploración al compartimento iluminado, y en la medida que eso no ocurre, debemos concluir que el condicionamiento al lado oscuro ha coexistido con una habituación de la exploración.

CAPÍTULO V:

PERSPECTIVAS DE LOS DOS PROCESOS DE MEMORIA COMO MODELOS EXPERIMENTALES.

Entre los objetivos de esta Tesis se cuenta la obtención de un nuevo modelo de memoria en el *Chasmagnathus granulatus*, que vendría así a sumarse a los ya usados en el Laboratorio de Fisiología del Comportamiento Animal de la UBA. La importancia de la diversidad de modelos experimentales en un mismo animal, ha sido repetidamente destacada por los estudiosos de procesos mnésicos (eg. Izquierdo, 1979).

Sin embargo, debe distinguirse entre la identificación de un proceso mnésico y su utilidad experimental como modelo. En efecto, para estos fines, un fenómeno de aprendizaje no sólo tiene que estar adecuadamente probado sino que debe ser lo suficientemente persistente, fácilmente reproducible, cuantificable y en lo posible automatizable a nivel de programa de estímulos y de registros, así como resistente a las perturbaciones de los tratamientos experimentales. Varias de estas condiciones parecen satisfechas, según se desprende de los estudios descriptos en los capítulos anteriores, pero algunos aspectos metodológicos relacionado con el uso del modelo, necesitan ser considerados.

1.- Los cangrejos no tienen inicialmente un mismo nivel exploratorio en la doble-cámara, y algunos pocos no abandonan CO antes del tiempo tope durante varios ensayos del entrenamiento. En experimentos de aprendizaje, tanto en los de habituación de la exploración como en los de condicionamiento instrumental, los resultados correspondientes a estos animales tendrían que ser excluidos, ya que la premisa es que todos los cangrejos **deben** explorar la doble-cámara, es decir, deben tener la posibilidad de ser estimulados por el entorno novedoso y conocer la consecuencia de su actividad. Por lo tanto, un procedimiento más estricto de análisis tendría que usar un **criterio de selección**. Sin embargo, si existiese alguna correspondencia entre el nivel exploratorio en la

doble-cámara y otras modalidades comportamentales, podría evitarse el uso de ese criterio, eligiendo por anticipado los cangrejos que se sabe serán activos.

2.- La estrategia de interferencia por el uso de drogas en estudios de memoria, suele realizarse mediante un tratamiento pre o post entrenamiento. Una condición de un buen modelo para estos fines, es que la sola administración del vehículo no tenga efectos amnésicos o detrimentales.

Los experimentos del presente Capítulo se llevaron a cabo con el propósito de encarar estos aspectos metodológicos del uso del modelo.

V. 1 EXPERIMENTO 1

El propósito del presente Experimento es saber si hay correspondencia entre el nivel de la actividad del cangrejo en la doble-cámara, en relación a dos tipos muy diferentes de comportamientos: a) la actividad exploratoria en un recipiente totalmente diferente; y b) la respuesta de escape ante la presentación de un peligro.

V. 1. 1. Método

Para estimar el nivel de la **respuesta de escape** ante un estímulo de peligro y la actividad exploratoria en un recipiente totalmente diferente a la doble-cámara, se utilizó el dispositivo experimental conocido como **Universal**, el que fuera diseñado y construido en el Laboratorio de

Fisiología del Comportamiento Animal de la UBA (Romano y col., 1990). La unidad experimental del **Universal** es el **actómetro**: un recipiente de plástico con paredes cóncavas y un piso circular (10 cm de diámetro) donde es alojado el animal. Un motor desplaza una pantalla opaca rectangular, cuyo movimiento produce una sombra que provoca en el cangrejo una **respuesta de escape**. Los movimientos del recipiente causados por la reacción del animal, o por su sola locomoción, inducen diferencias de potencial en un elemento piezoeléctrico de una cápsula fonográfica que son amplificados, integrados temporalmente y traducidos a lenguaje digital para ser procesados por una computadora. El **Universal** cuenta con un total de 40 actómetros.

Se formaron dos grupos de 78 animales cada uno: el grupo *escape* y el grupo *actividad*. Ambos grupos fueron colocados durante el Día 1 en actómetros del **Universal**. Los del grupo *escape* recibieron una sesión de dos ensayos, separados por un intervalo de 3 min, cada ensayo consistiendo de cuatro pasajes de la pantalla opaca sobre el actómetro durante 9 segundos. Los cangrejos del grupo *actividad* permanecieron 30 segundos en el actómetro sin ser estimulados, pero registrándose el total de su actividad en el recipiente, durante ese intervalo.

Debe señalarse que las dos actividades registradas en el actómetro son sustancialmente distintas. La **respuesta de escape** consiste en una huida del animal, intentando escapar ante el pasaje de la sombra, aunque sin lograrlo debido a las características del recipiente (paredes cóncavas de mucha pendiente), de manera que la actividad total durante cada ensayo aparece como una serie de desplazamientos rápidos y orientados, desde el centro hacia la base de las paredes. La **actividad exploratoria** en el actómetro, consiste en una locomoción lenta y no dirigida sobre el centro chato del recipiente, limitándose a una serie de giros sin intentos

de trepar por las paredes cóncavas.

Durante el Día 2, ambos grupos fueron sometidos a dos ensayos sin refuerzo en la **doble-cámara**, con el mismo procedimiento usado en los Experimentos del Capítulo IV.

V. 1. 2 Resultados y Discusión

La Figura 18 presenta una comparación entre los valores de **respuesta de escape** de cada animal y su correspondiente actividad exploratoria en la **doble-cámara**, mientras que la Figura 19 muestra la relación entre la **actividad exploratoria** en los dos dispositivos. Como ya resulta de la simple observación de estos gráficos, se concluye que no hay correlación entre esos comportamientos (Correlación de Pearson: $r = -0.06$, $t = 0.53$; y $r = -0.05$, $t = 0.48$; respectivamente).

De ahí entonces que no resulta viable el uso de un método alternativo en lugar del **criterio de selección** usado en esta Tesis. Además, es interesante destacar que pese al hecho de que las tres respuestas analizadas (**exploratoria** en el actómetro, **exploratoria** en la **doble-cámara** y **escape**) implican una actividad locomotora del cangrejo, su nivel de respuesta no es el mismo. Por lo tanto, parecería que el nivel de respuesta no está determinado exclusivamente por la mayor o menor capacidad de locomoción, sino por la estrategia que usa el animal ante un estímulo de peligro o por el valor motivacional de un nuevo entorno.

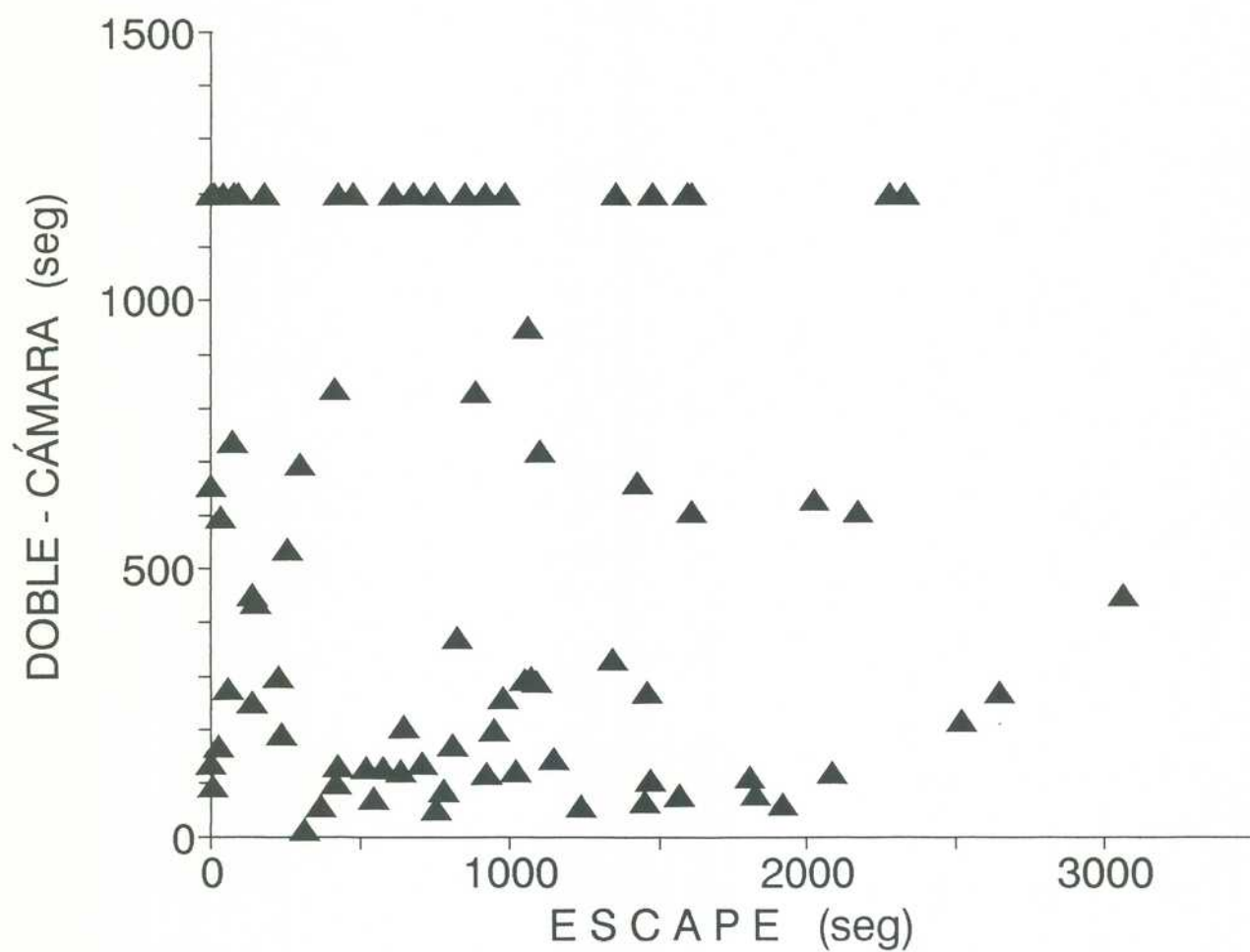


FIGURA 18: Comparación entre los valores de la **respuesta de escape** de cada animal y su actividad en la **doble-cámara**. $r = -0.06$, $t = 0.53$ (Correlación de Pearson)

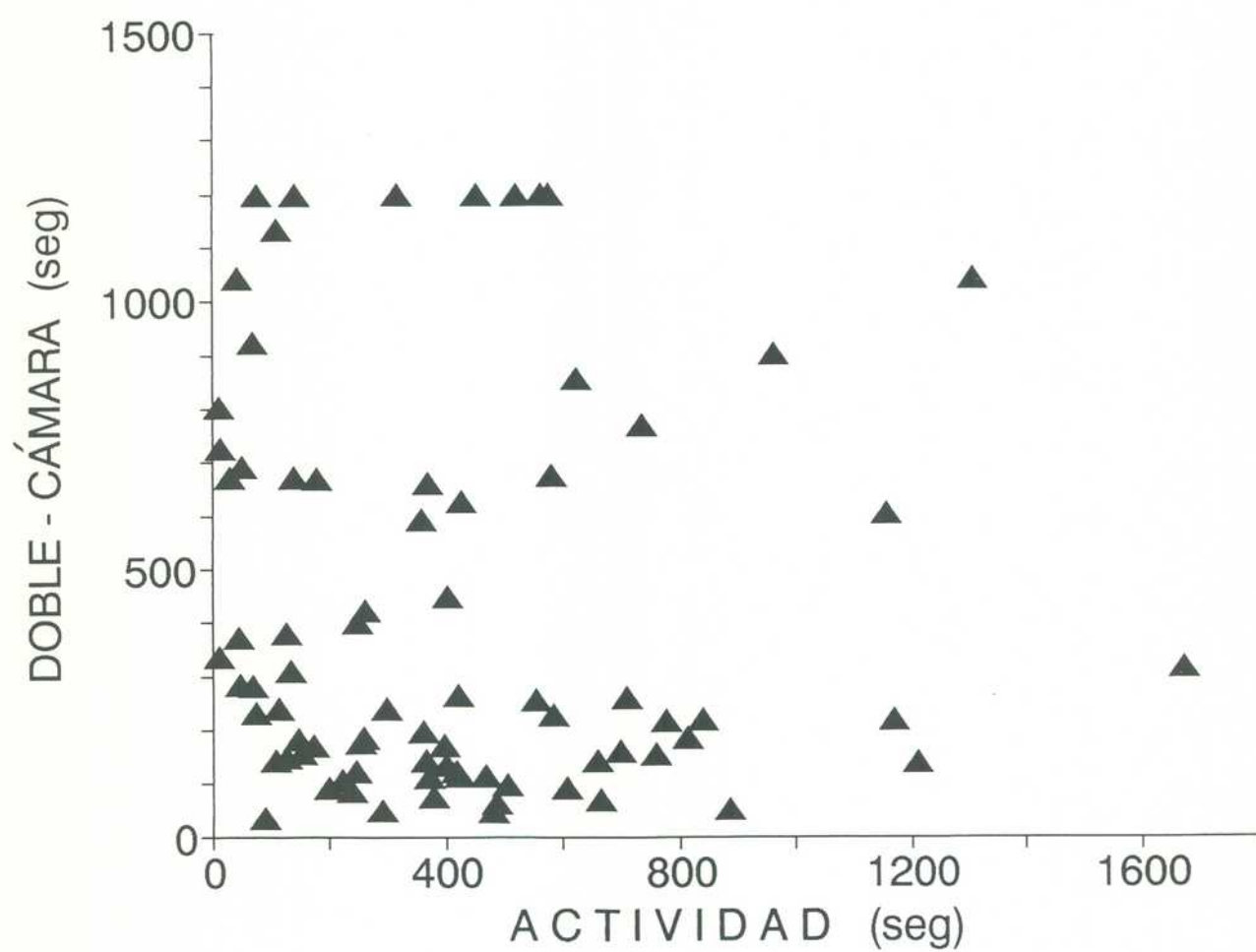


FIGURA 19: Comparación entre la actividad exploratoria en los dos dispositivos. $r = -0.05$, $t = 0.48$ (Correlación de Pearson)

V. 2 Experimento 2

El propósito de este experimento fue estimar la influencia que una inyección de 100 μ l de agua destilada, dada antes o inmediatamente después del entrenamiento, podía tener sobre la retención del condicionamiento instrumental apetitivo. El agua destilada o una solución salina (12 o/oo de ClNa) es indistintamente usada como vehículo en experimentos de administración de drogas en *Chasmagnathus*, sin que se haya podido advertir un efecto diferente por el empleo de uno u otro medio (Lozada y col., 1988). Por otra parte, el volúmen de 100 μ l es el comunmente utilizado y representa aproximadamente el 2 % del volúmen total de hemolinfa (Gleeson y Zubkoff, 1977).

V. 2. 1 Método

Doscientos cangrejos fueron asignados al azar en igual número para cada celda de un diseño factorial 2×2 , siendo los factores **alimento** (*alimento*: un trozo de pescado en CC en cada ensayo del entrenamiento; *control*: sin alimento en la doble-cámara) y **momento de la inyección** (*pre-entrenamiento* y *post-entrenamiento*). De esta manera se formaron cuatro grupos: **Control-Pre**, **Alimento-Pre**, **Control-Post** y **Alimento-Post**. Se dió una sesión de entrenamiento y otra de retención, ambas con cinco ensayos cada una, 10 min entre ensayos y 24 horas entre sesiones. Se usó el mismo **criterio de selección** empleado en experimentos anteriores.

V. 2. 2 Resultados y Discusión

En la sesión de entrenamiento, veintiun animales del total de cien pre-inyectados (grupos *alimento-pre* y *control-pre*) no alcanzaron el **criterio de selección**, contra 11 de los cien que no habían sido pre-inyectados (grupos *alimento-post* y *control-post*). Sin embargo, el valor de la latencia media (seg) del primer ensayo para los pre-inyectados aceptados (243.3 ± 22.6), no resultó significativamente diferente de la media para los respectivos post-inyectados (209.2 ± 20.8). Por lo tanto, si bien la inyección *per se* parece producir en algunos cangrejos un efecto detrimental de tipo paralizante, en aquellos que no presentan ese síntoma, el comportamiento resulta similar al de los no-inyectados.

La Figura 20 presenta la media de las latencias acumuladas por animal durante los dos primeros ensayos de la retención. Es evidente que los dos grupos *alimento* muestran menores latencias que los grupos *control*. Un ANOVA de un factor realizado sobre estos datos, puso de manifiesto un efecto significativo del tratamiento [$F(3, 164) = 4.69, p < 0.005$]; y un test de Duncan para comparaciones múltiples demostró diferencias significativas para *alimento-pre* vs *control-pre* ($p < 0.005$) y para *alimento-post* vs *control-post* ($p < 0.05$), pero no para las comparaciones entre los grupos *control* o entre los grupos *alimento*.

Así, la administración de 100 μ l de vehículo no parece interferir con la adquisición y/o retención del condicionamiento instrumental apetitivo. Es decir, no tienen efecto amnésico, ya sea por bloqueo de la adquisición, por interrupción, o por dependencia de estado (Izquierdo, 1984).

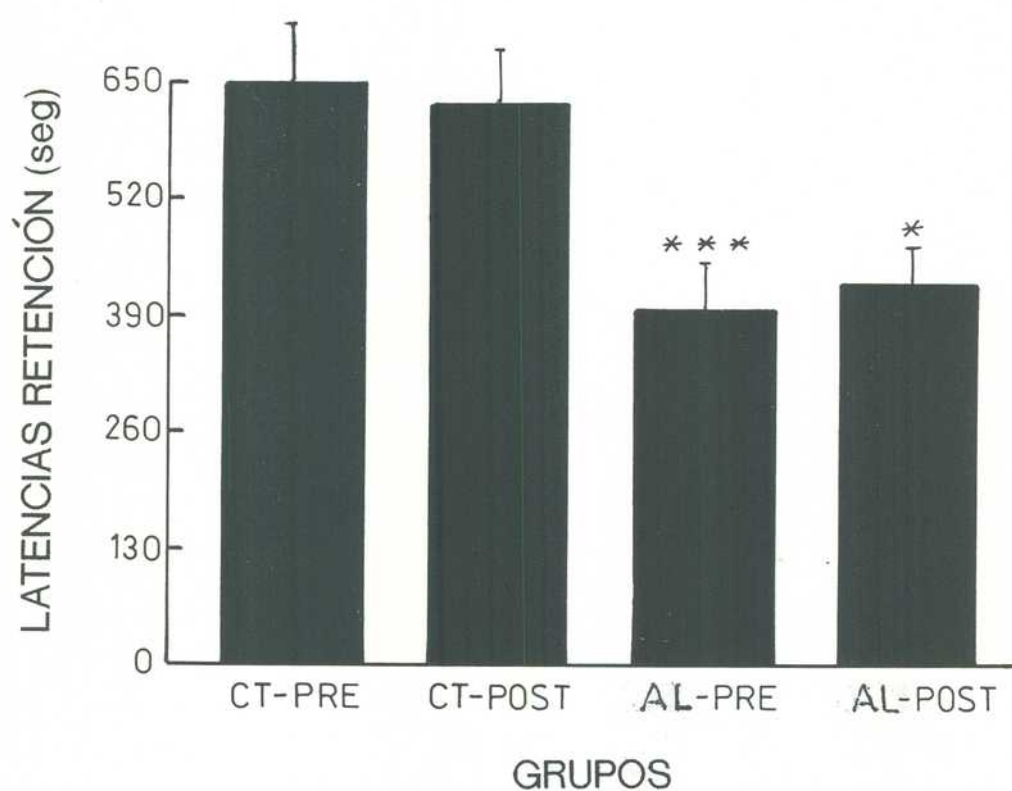


FIGURA 20: Sesión de retención. Cada barra representa la media de las latencias acumuladas por animal durante los dos primeros ensayos. La línea vertical sobre las barras indica el error standard. *** $p < 0.005$; * $p < 0,05$ (Test de Duncan)

CAPÍTULO VI:

CONCLUSIONES

1.- La actividad exploratoria de *Chasmagnathus*, provocada por su instalación en un ambiente nuevo, y medida por la latencia a pasar de un compartimento inicial oscuro a otro iluminado (CO→CC), disminuye con el tiempo. Este decremento persiste al menos durante 24 horas y se lo identifica con un proceso de **habitua**ción en cuanto es estímulo-específico.

2.- Si el cangrejo es reforzado con alimento en CC, la latencia tiende a no aumentar durante la sesión de entrenamiento y persiste con bajos valores después de 24 horas, contrastando con lo que ocurre con los controles (sin refuerzo). Si el cangrejo es reforzado con alimento en CO, inmediatamente después de cada ensayo, la latencia aumenta durante el entrenamiento y este incremento persiste al menos después de 24 horas, de manera similar a la de los controles. Estos hechos son interpretados como demostrativos de un condicionamiento instrumental apetitivo que es compartimento-específico; es decir, que como consecuencia de su exploración, el cangrejo aprende la ubicación del refuerzo en la doble-cámara. El aprendizaje determina, en un caso, una mayor celeridad en el pasaje CO→CC, y en el otro, una tendencia a permanecer en CO.

En resumen, los resultados de esta Tesis demuestran la posibilidad de un condicionamiento instrumental apetitivo en la doble-cámara, sugiriendo, además, que ese proceso de aprendizaje se da simultáneamente con una habituación de la exploración. Tal simultaneidad está conforme con la idea expuesta en la Introducción, según la cual la habituación de la exploración es un proceso necesariamente contingente a cualquier otro proceso mnésico.

3.- Los paradigmas de habituación de la exploración y de condicionamiento instrumental apetitivo, demuestran ser lo suficientemente robustos como para ser considerados buenos modelos experimentales en estudios de memoria y aprendizaje a nivel celular y molecular.

CAPÍTULO VII:

BIBLIOGRAFÍA

- Abbott J (1970) Absence of blood-brain barrier in a crustacean, *Carcinus maenas* L. *Nature* 225 : 291-293
- Abramson CI, Feinman RD (1987) Operant punishment of eye elevation in the green crab, *Carcinus maenas*. *Behav Neur Biol* 48 : 259-277
- Abramson CI, Feinman RD (1988) Classical conditioning of the eye withdrawal reflex in the green crab. *J Neuroscience* 8 : 2908-2912
- Abramson CI, Armstrong PM, Feinman RA, Feinman RD (1988) Signaled avoidance in the eye withdrawal reflex of the green crab. *J Exp Anal Behav* 50 : 483-492
- Balderrama N, Maldonado H (1973) Ontogeny of the behaviour in the praying mantis. *J. Insect Physiol.* 19 : 319-336
- Bardo MT, Neisewander JL, Pierce RC (1989) Novelty-induced place preference behavior in rats: effects of opiate and dopaminergic drugs. *Pharmacol Biochem Behav* 32 : 683-689
- Bindra D; Spinner N (1958) Response to different degrees of novelty: The incidence of various activities. *J Exp Anal Behav* 1 : 341-350
- Blodgett HC (1929) The effect of the introduction of reward upon the maze performance of rats. *Univ. Cal. Publ. Psychol.* 4 : 113-134

- Boakes RA (1977) Performance on learning to associate a stimulus with positive reinforcement. In: Davis H, Hurwitz MB (eds) Operant-pavlovian interactions. Hillsdale, NJ: Erlbaum.
- Boschi EE (1964) Los crustáceos decápodos brachyura del litoral bonaerense. Bol. Inst. Biol. Mar. (Mar del Plata) 6: 1-76
- Botto JL y Irigoyen HR (1979) Bioecología de la comunidad del cangrejal. En: Mem. Seminario sobre Ecología bentónica y sedimentación de la Plataforma Continental del Atlántico Sur. Unesco pp 161-169
- Brunner D, Maldonado H (1988) Habituation in the crab *Chasmagnathus granulatus*: effect of morphine and naloxone. J Comp Physiol A 162 : 687-694
- Carlton PL, Vogel JR (1965) J Comp Physiol Psychol 63 : 348-351
- Davis M, Wagner AR (1969) Habituation of startle response under incremental sequence of stimulus intensities. J Comp Physiol Psychol 67 : 486-492
- Delorge JO (1968) Exploratory behavior in goldfish. En Animal behavior in laboratory and field, ed. A.W. Stokes; pp 167-170. W.H. Freeman and Company. San Francisco and London
- Denti A, Dimant B, Maldonado H (1988) Passive avoidance learning in the crab *Chasmagnathus granulatus*. Physiol Behav 43 : 317-320

- Dezi RE, Rodríguez EM, Lenge ME (1987) Estudios del metabolismo energético en especies del cangrejal de la provincia de Buenos Aires. I. Tasa metabólica en machos de *Uca uruguayensis* y *Chasmagnathus granulata* (Crustácea, Decápoda, Brachyura). Physis (Buenos Aires), Secc. A 45 (109) : 47-60
- D' Incao F, Da Silva KG, Ruffino ML, Da Costa Braga A (1990) Hábito alimentar do carangrejo *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 na barra do Rio Grande, RS (Decapoda, Grapsidae). Atlantica, Rio Grande 12 (2) : 85-93
- Drzewina A (1910) Création d' associations sensorielles chez les crustacés. Compt. Rend. Soc. Biol. Paris 68 : 573-575
- Erber J, Sandeman DC (1990) The modulation of the optokinetic response by serotonin and octopamine in the crab *Leptograpsus variegatus*. En: Frontiers in crustacean neurobiolog. ed K. Wiese... Basel. Boston. Berlin
- Erber J, Sandeman DC The effect of serotonin and octopamine on the optokinetic response of the crab *Leptograpsus variegatus*. J Neurobiol (en prensa)
- Faiman CP (1989) Posible relación entre los efectos de la vasopresina y la actividad de mecanismos colinérgicos sobre procesos de memoria. Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia y Bioquímica UBA

- Feinman RD, Abramson CI (1987) Demonstration of classical conditioning of eye withdrawal in the green crab. Soc. Neurosci. Abstr. 13 : 814
- Feinman RD, Abramson CI, Forman RR (1987) Electromyographic recording of classical conditioning in the green crab. Biol. Bull. 172 : 437
- Feinman RD, Llinas RH, Abramson CI, Forman RR (1990) Electromyographic record of classical conditioning of eye withdrawal in the crab. Biol Bull 178 : 187-194
- Ferguson D (1967) Sun-compass orientation in anurans. In : Storm R (ed) Animal orientation and navigation. Oregon State Univ Press, Corvallis, Oregon, pp 21-31
- Ferguson GP, Messenger JB (1991) A countershading reflex in cephalopods. Proc. R. Soc. Lond. B 243 : 63-67
- Fernández-Duque E, Valeggia C, Maldonado H Multitrial inhibitory avoidance learning in the crab *Chasmagnathus*. Behav. Neural Biol. (en prensa)
- File SE, Wardill AG (1975) The reliability of the hole-board apparatus. Psychopharmacologia 44 (1) : 47-51
- File SE, Wardill AG (1975) Validity of head-dipping as a measure of exploration in a modified hole-board Psychopharmacologia 44 (1) : 53-59

- File SE (1976) Effects of perachlorophenylalanine and amphetamine on habituation of orienting Pharm Biochem Behav 3 (6) : 979-983
- Glanzer M (1953) Stimulus satiation: An explanation of spontaneous alternation and related phenomena. Psychological Review 60 : 257-268
- Gleeson RA, Zubkoff PL (1977) The determination of hemolymph volume in the blue crab, *Callinectes sapidus*, utilizing ¹⁴C-thiocyanate. Comp Biochem Physiol (A) 56 (3) : 411-413
- Groves PM, Thompson RF (1970) Habituation: a dual-proces theory. Psychol Rev 77 : 419-450
- Hall DNF (1956) Ink ejection by Cephalopoda. Nature 177 : 663
- Hazlett BA (1969) 'Individual' recognition and agonistic behaviour in *Pagurus bernhardus*. Nature, Lond. 222 : 268-269
- Hazlett BA, Estabrook GF (1974) Examination of agonistic behavior by character analysis II. Hermit crabs. Behaviour 49 : 88-110
- Heinrich B (1979) Foraging strategies of caterpillars: Leaf damage and possible predator avoidance strategies. Oecologia 42 : 325-337
- Hermitte G, Maldonado H Conditioned facilitatory modulation of the response to an aversive stimulus in the crab *Chasmagnathus*. Physiol Behav 51 (1) (en prensa)

- Herrnkind WF (1983) Movement patterns and orientation. En : Vernberg FJ, Vernberg WG (eds) The biology of crustacea, vol 7. Behavior and ecology. Academic Press, New York, pp 41-105
- Hess EJ, Albers LJ, Le H, Creese I (1986) Effects of chronic SCH23390 treatment on the biochemical and behavioral properties of D₁ and D₂ dopamine receptors. J Pharm Exp Therapeutics 238 : 846-855
- Heymer A (1982) Diccionario etológico. ed. Omega, pp 69
- Introini-Collison IB, Cahill L, Baratti CM, Mc Gaugh JL (1987) Dinorphin induces task-specific impairment of memory. Psychobiology 15 : 171-174
- Izquierdo I, Cavalleiro EA (1976) Three main factors in rat shuttle behavior: their pharmacology and sequential entry in operation during a two way avoidance session. Psychopharmacology 49 : 145-157
- Izquierdo I (1979) Effect of naloxone and morphine on various forms of memory in the rat: Possible role of endogenous opiate mechanisms in memory consolidation. Psychopharmacology 66 : 199-203
- Izquierdo I (1984) Endogenous state dependency: memory depends on the relation between the neurohumoral and hormonal states present after training and at the time of testing. En: Neurobiology of learning. eds. G Lynch, JL Mc Gaugh, NM Weinberger, pp 333-350. New York: Raven Press

- Izquierdo I, Souza DO, Dias RD, Carrasco MA, Volkmer N, Perry MLS, Netto CA (1984) Effect of various behavioral training and testing procedures on brain beta-endorphin-like immunoreactivity, and the possible role of beta-endorphin in behavioral regulation. *Psychoneuroendocrinology* 9 : 381-389
- Izquierdo I, Netto CA (1985 a) The role of beta-endorphin in behavioral regulation. *Annals of the New York Academy of Sciences* 444 : 162-167
- Izquierdo I, Netto CA (1985 b) Factors that influence retrieval measured 0, 3, or 6 hours after inhibitory avoidance training. *Behavioral and Neural Biology* 43 : 260-273
- Jackson NW, Elwood RW (1989) Memory of information gained during shell investigation by the hermit crab, *Pagurus bernhardus*. *Anim Behav* 37 (4) : 529-534.
- Jackson NW, Elwood RW (1989) How animals make assessments: information gathering by the hermit crab *Pagurus bernhardus*. *Animal Behav* 38 (6) : 951-957
- Johnson VR (1977) Individual recognition in the banded shrimp *Stenopus hispidus* (Olivier). *Anim. Behav.* 25 : 418-428
- Leaton RN (1968) *J Comp Physiol Psychol* 66 : 524-527

- Le Moal M, Dantzer R, Mormede P, Baduel A, Lebrun C, Ettenberg A, Vander Kooy D, Wenger J, Deyo S, Koob GF, Bloom FE (1984) Behavioral effects of peripheral administration of arginine vasopressin: a review of our search for a mode of action and a hypothesis. *Psychoneuroendocrinology* 9 : 319-341
- Lozada M, Romano A, Maldonado H (1988) Effect of morphine and naloxone on a defensive response of the crab *Chasmagnathus granulatus*. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 30 : 635-640
- Lozada M, Romano A, Maldonado H (1990) Long-term habituation to a danger stimulus in the crab *Chasmagnathus granulatus*. *Physiol Behav* 47 : 35-41
- Maier, NRF (1932) A study of orientation in the rat. *J. Comp. Psychol.* 14 : 387-399
- Maldonado H (1970) The deimatic reaction in the praying mantis *Stagmatoptera biocellata*. *Z. Vergl. Physiologie* 68 : 60-71
- Maldonado H, Romano A, Lozada M (1989) Opioid action on response level to a danger stimulus in the crab *Chasmagnathus granulatus*. *Behav Neurosci* 103 : 1139-1143
- Martínez EA, Murray M, Leung MK, Stefano GB (1988) Evidence for dopaminergic and opioid involvement in the regulation of locomotor activity in the land crab *Gecarcinus lateralis*. *Comp Biochem Physiol* 90C : 89-93

- Meyers B, Domino EF (1964) Arch Intern Pharmacodyn Ther 150 : 525-529
- Montserrat JM, Rodriguez EM, Lombardo RJ Effects of salinity on the toxicity of Parathion to the estuarine crab *Chasmagnathus granulata* (Decapoda, Grapsidae). Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 46 (en prensa)
- Nalbach HO (1990) Visually elicited escape in crabs. En: Frontiers in crustacean neurobiology ed. K. Wiese Basel. Boston. Berlin
- Netto CA, Dias RD, Izquierdo I (1986) Differential effect of posttraining naloxone, B-endorphin, leu-enkephalin and electroconvulsive shock administration upon memory of an open-field habituation and of a water-finding task. Psychoneuroendocrinology 11 (4) : 437-446
- Netto CA, Oliveira CB, Gianlupi A, Quillfeldt J, Izquierdo I (1987) Pre-test administration of B-endorphin, or of electroconvulsive shock reverses the memory disruptive effect of posttraining electroconvulsive shock. Peptides 8 : 605-608
- Nishimoto R (1980) Orientation, movement patterns and behavior of *Callinectes sapidus* Rathbun (Crustacea: Portunidae) in the intertidal. Ph D. Diss. Florida State Univ, Tallahassee, Florida
- Peeke HVS, Veno A (1976) Response independent habituation of territorial aggression in the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*). Zeitschrift fur Tierpsychologie 40 : 53-58

- Peeke HVS (1984) Habituation and the maintenance of territorial boundaries. En Habituation, sensitization and behavior, ed HVS Peeke, L Petrinovich: pp 393-421. Academic Press, New York
- Platel A, Porsolt RD (1982) Habituation of exploratory activity in mice: A screening test for memory enhancing drugs. *Psychopharmacology* 78 : 346-352
- Poucet B (1989) Object exploration, habituation, and response to a spatial change in rats following septal or medial frontal cortical damage. *Behavioral Neuroscience* 103 (5) : 1009-1016
- Rakitín A, Maldonado H, Tomsic D (1991) Habituation and sensitization to an electrical shock in the crab *Chasmagnathus*. Effect of background illumination. *Physiol Behav* 50 (3) :
- Reaka ML (1980) On learning and living in holes by mantis shrimp. *Anim. Behav.* 28 : 111-115
- Rescorla RA (1988) Behavioral studies of Pavlovian conditioning. *Ann Rev Neurosci* 11 : 329-352
- Roccatagliatta D y Schiavinni A (1987) Influencia en la dinámica de materia orgánica y sedimento debida a la actividad biológica de *Chasmagnathus granulata*. Seminario del Curso de Ecología Marina, San Antonio Oeste. 19 pp

- Rodgers RJ, Richards C, Precious JI (1984) Naloxone administration following brief exposure to novelty reduces activity and rearing in mice upon 24-hr retest: a conditioned aversion?. *Psychopharmacology* 82 : 322-326
- Rodríguez EM, Dezi RE (1987) Análisis de la composición del peso vivo en machos de *Uca uruguayensis* y *Chasmagnathus granulata* (Crustácea, Decápoda, Brachyura). *Physis* (Buenos Aires) Secc. A 45 (109) : 47-60
- Rodríguez EM, Lombardo RJ (1991) Acute toxicity of Parathion and 2,4-D to estuarine adult crabs. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 46 (4) : 576-582
- Rodríguez EM, Amín OA Acute toxicity of Parathion and 2,4-D to larval and juvenil stages of *Chasmagnathus granulata* (Decapoda, Brachyura). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* (en prensa)
- Rodríguez EM, Montserrat JM Acute and chronic effects of Parathion and 2,4-D on the oxygen consumption of *Chasmagnathus granulata* (Decapoda, Brachyura). *Acta Physiologica et Pharmacologica Latinoamericana* XLI (1) (en prensa)
- Romano A, Lozada M, Maldonado H (1990) Effect of naloxone pretreatment on habituation in the crab *Chasmagnathus granulatus*. *Behav Neural Biol* 53 : 113-122

- Romano A, Lozada M, Maldonado H (1991) Non-habituation processes affect stimulus specificity of the response-habituation in the crab *Chasmagnathus* Behav Neurosci 105 : 542-552
- Sandeman DC (1967) Proc. Roy. Soc. B 168 : 82
- Sandeman DC (1990) Structural and functional levels in the organization of decapod crustacean brains. En: Frontiers in crustacean neurobiology ed. K. Wiese... Basel. Boston. Berlin
- Santos EA, Colares EP (1986) Blood glucose regulation in an intertidal crab, *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851). Comp Biochem Physiol 83A (4) : 673-675
- Santos EA, Baldisseroto B, Bianchini A, Colares EP, Nery LEM, Manzoni GC (1987) Respiratory mechanisms and metabolic adaptations of an intertidal crab, *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851). Comp Biochem Physiol 88A (1) : 21-25
- Santos EA, Nery LEM, (1987) Lood glucose regulation in an estuarine crab, *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851). Comp Biochem Physiol 87A (4) : 1033-1035
- Santos EA, Nery LEM, Manzoni GC (1988) Action of the crustacean hyperglycemic hormone of *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851) (Decapoda: Grapsidae). Comp Biochem Physiol 89A (3) : 329-332

- Santos EA, Stefanello TM (1991) The hemolymph of *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 (Decapoda, Grapsidae) as a target tissue of the crustacean hyperglycemic hormone. *Brazilian J Med Biol Res* 24 : 267-270
- Squire RL (1969) *J Comp Physiol Psychol* 69 : 69-75
- Tenen SS (1965) Retrograde amnesia from electroconvulsive shock in a one-trial appetitive learning task. *Science* 148 : 1248-1250
- Thompson RF, Spencer WA (1966) Habituation: A model phenomenon for the study of neuronal substrates of behavior. *Psychological Review* 43 : 258-281
- Thorpe WH (1963) *Learning and instinct in animals* (segunda edicion). London: Methuen
- Tinbergen N (1959) Comparative studies of the behavior of gulls (Laridae): A progress report. *Behaviour* 15 : 1-70
- Tomsic D, Maldonado H (1990) Central effect of morphine pretreatment on short- and long-term habituation to a danger stimulus in the crab *Chasmagnathus*. *Pharmacol. Biochem. and Behavior* 36 : 787-793
- Tomsic D, Maldonado H, Rakitín A (1991) Morphine and GABA: Effects on perception, escape response and long-term habituation to danger stimulus in the crab *Chasmagnathus*. *Brain Res Bull* 26 : 699-706

Valeggia C, Fernández Duque E, Maldonado H (1989) Danger stimulus-induced analgesia in the crab *Chasmagnathus granulatus*. Brain Res 481 : 304-308

Welker WI (1959) Escape, exploratory, and food-seeking responses of rats in a novel situation. J Comp Physiol Psychol 52 : 106-111

Zimmer-Faust RK (1987) Crustacean chemical perception: towards a theory on optimal chemoreception. Biol Bull 172 : 10-29